

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

## **FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

### **Departamento de Biología Celular**



## **MODULACIÓN DE RECEPTORES DE GLUTAMATO POR IGF-I**

### **MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR**

Alberto González de la Vega

Bajo la dirección de los Doctores:  
Ignacio Torres Alemán  
Washington Buño Buceta

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-1695-4**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Biología Celular

# **MODULACIÓN DE RECEPTORES DE GLUTAMATO POR IGF-I**

TESIS DOCTORAL

ALBERTO GONZÁLEZ DE LA VEGA  
Madrid, 2001

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Biología Celular

## **MODULACIÓN DE RECEPTORES DE GLUTAMATO POR IGF-I**

Memoria que para optar al grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas presenta

**Alberto González de la Vega**

Realizada en el **Instituto Cajal (CSIC)** bajo la dirección del Dr.  
**Ignacio Torres Alemán** y el Dr. **Washington Buño Buceta**

VºBº de los Directores de la tesis

*Ignacio Torres Alemán*

*Washington Buño Buceta*

VºBº del Tutor

El Interesado

*Mª Teresa Solas Alados*

*Alberto González de la Vega*

Madrid, año 2001

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA, I (IGF-I)</b>	<b>1</b>
1.1. FACTORES NEUOTRÓFICOS Y TEORÍA NEUOTRÓFICA	1
1.2. EL IGF-I COMO FACTOR TRÓFICO	2
1.2.1. Factores de crecimiento de tipo insulina: IGF-I e IGF-II	3
1.2.2. Proteínas transportadoras (BPs)	4
1.2.3. Receptores de membrana	5
1.2.4. Ruta de señalización intracelular	6
1.3. EL IGF-I EN EL SISTEMA NERVIOSO: LOCALIZACIÓN Y FUNCIONES	8
1.3.1. Sistema IGF-I en cerebelo	9
<b>2. RECEPTORES DE GLUTAMATO</b>	<b>12</b>
2.1. FUNCIONES DEL GLUTAMATO EN EL SISTEMA NERVIOSO	12
2.2. TIPOS DE RECEPTORES DE GLUTAMATO	13
2.2.1. Estructura molecular de los receptores de glutamato	14
2.2.2. Receptores de tipo AMPA	16
2.2.3. Receptores de tipo Kainato	17
2.2.4. Receptores de tipo NMDA	19
2.2.5. Receptores metabotrópicos de glutamato	20
2.3. RECEPTORES DE GLUTAMATO Y PLASTICIDAD SINÁPTICA	22
2.3.1. Modulación de los receptores de glutamato por procesos de fosforilación/desfosforilación	25
2.3.2. Mecanismos de anclaje y modulación de los receptores de glutamato en la sinapsis excitatoria	27
2.3.3. Modulación del número y disponibilidad de los receptores de glutamato en la membrana postsináptica	29
2.3.3.1. Proceso de Endocitosis/Exocitosis	30
2.3.3.2. Interacciones con el citoesqueleto	31

<b>3.</b>	<b>FACTORES TRÓFICOS Y PLASTICIDAD SINÁPTICA</b>	<b>34</b>
3.1.	FACTORES TRÓFICOS COMO NEUROMODULADORES: EL IGF-I COMO NEUROMODULADOR	34

## **MATERIALES Y MÉTODOS** **38**

<b>1.</b>	<b>CULTIVO DE CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO</b>	<b>38</b>
<b>2.</b>	<b>INMUNOCITOQUÍMICA</b>	<b>40</b>
<b>3.</b>	<b>INMUNOPRECIPITACIÓN</b>	<b>42</b>
<b>4.</b>	<b>ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT</b>	<b>44</b>
<b>5.</b>	<b>EXTRACCIÓN DE MEMBRANAS CELULARES</b>	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>ELECTROFISIOLOGÍA</b>	<b>48</b>
6.1.	EQUIPOS Y SOLUCIONES EMPLEADAS	48
6.1.1.	Cámara de registro	48
6.1.2.	Microelectrodos	48
6.1.3.	Sistema de perfusión y estimulación	49
6.1.4.	Soluciones de registro	49
6.1.5.	Drogas y Toxinas	51
6.2.	DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA	52

## **RESULTADOS** **54**

<b>1.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO DE CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO</b>	<b>54</b>
1.1.	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	54
1.2.	CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA	55
<b>2.</b>	<b>EFFECTOS MODULADORES DEL IGF-I SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO</b>	<b>58</b>

2.1.	DEPRESIÓN DE LAS RESPUESTAS DEL RECEPTOR DE AMPA INDUCIDA POR IGF-I	59
2.2.	POTENCIACIÓN DE LAS RESPUESTAS DEL RECEPTOR DE KAINATO INDUCIDA POR IGF-I	59
2.3.	EL IGF-I NO TIENE EFECTO SOBRE LAS RESPUESTAS DE LOS RECEPTORES DE NMDA	60
2.4.	EL IGF-I TIENE UN DOBLE EFECTO SOBRE LAS RESPUESTAS INDUCIDAS POR EL GLUTAMATO	61
3.	ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN EL EFECTO MODULADOR DEL IGF-I SOBRE LOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO	62
3.1.	VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA MODULACIÓN POR IGF-I DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE KAINATO	62
3.2.	MECANISMO MOLECULAR IMPLICADO EN LA DEPRESIÓN DEPENDIENTE DE IGF-I DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE AMPA	63
3.2.1.	Modulación por IGF-I de la disponibilidad de receptores de AMPA en la membrana plasmática de la célula postsináptica	64
3.2.2.	Modificación del estado de fosforilación de una proteína asociada a la subunidad 2/3 del receptor de AMPA	66
3.3.	MOLÉCULAS MEDIADORAS DEL EFECTO DEL IGF-I SOBRE LAS RESPUESTAS DEL RECEPTOR DE AMPA	68
3.3.1.	Interacción de la proteín-quinasa Lyn con la subunidad 2/3 del receptor de AMPA y modulación por el IGF-I	69
3.3.2.	Interacción de la proteín-quinasa Fyn con la subunidad 2/3 del receptor de AMPA y modulación por el IGF-I	71
3.3.3.	Interacción de la proteín-quinasa GSK-3 $\beta$ con la subunidad 2/3 del receptor de AMPA y modulación por el IGF-I	74

## DISCUSIÓN

77

1.	OBJETO DEL ESTUDIO	78
2.	MODULACIÓN POR IGF-I DE LA ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO	82
3.	MODULACIÓN DE LA DISPONIBILIDAD DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA INDUCIDA POR IGF-I	87
4.	MODULACIÓN POR EFECTO DEL IGF-I DE LOS COMPLEJOS MULTIMOLECULARES ASOCIADOS AL RECEPTOR DE AMPA	87
4.1.	ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA LYN CON EL RECEPTOR DE AMPA. MODULACIÓN POR IGF-I	90
4.2.	ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA FYN CON EL RECEPTOR DE AMPA. MODULACIÓN POR EL IGF-I	93
4.3.	ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA GSK-3 $\beta$ CON EL RECEPTOR DE AMPA. MODULACIÓN POR EL IGF-I	97
5.	MODULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO DEPENDIENTE DE IGF-I: SIGNIFICADO FUNCIONAL	103

## CONCLUSIONES

105

## BIBLIOGRAFÍA



## INTRODUCCIÓN

---

### 1. FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA, I (IGF-I)

#### 1.1. FACTORES NEUOTRÓFICOS Y TEORÍA NEUOTRÓFICA

Los factores neurotróficos regulan la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de poblaciones seleccionadas de neuronas en el sistema nervioso central (**SNC**) y periférico (**SNP**). El concepto de factor trófico surgió durante la década de los cincuenta a partir del hallazgo del primer factor de crecimiento o factor trófico denominado **Factor de Crecimiento Nervioso** (*Nerve Growth Factor* o **NGF**) (*Levi-Moltancini, 1987*). Esta molécula era capaz de promover la supervivencia, el crecimiento neurítico y la producción de neurotransmisores de las neuronas simpáticas del sistema nervioso periférico. Se vio que era sintetizado por la célula diana y usado por la neurona aferente y que, en función de su disponibilidad, se modulaba el tamaño de dicha población aferente. Estos y otros descubrimientos llevaron a la formulación de la **teoría trófica de las conexiones neuronales** (*Easter, S. S., Jr. et al., 1985*). En ella se define como factor neurotrófico a la señal producida por las células inervadas y que actúa retrógradamente sobre las neuronas que las inervan aunque, en los últimos años se ha visto que también hay influencias de las propias aferencias sobre la célula postsináptica. Mediante esta teoría quedaba explicado el fenómeno de muerte neuronal que ocurre en el sistema nervioso durante el desarrollo: durante los estadios iniciales del desarrollo embrionario se produce una sobreproducción de neuronas y todas aquellas células que no establezcan conexiones con sus células diana, o que lo hagan de forma incorrecta, morirán ya que no recibirán el correcto aporte de factores tróficos imprescindible para la supervivencia neuronal durante el desarrollo (*Nieto-Sampedro, M. et al., 1998; Oppenheim, R.W., 1991; Purves, D., 1988*).

Actualmente se sabe que los factores tróficos se sintetizan en todos los tejidos del organismo y que participan en numerosos procesos biológicos tanto en el desarrollo como en el individuo adulto. En el cerebro existe una producción muy abundante de estos factores y se sabe que las células nerviosas están embebidas en un ambiente trófico durante toda su vida. Los factores tróficos participan tanto en la formación y el desarrollo del sistema nervioso como en el mantenimiento de la estructura y función cerebral, llegando incluso a mediar procesos de aprendizaje y memoria en el individuo adulto (*Agnati, L. F. et al., 1995*).

### 1.2. EL IGF-I COMO FACTOR TRÓFICO.

El **IGF-I** es un factor trófico que pertenece a una familia de proteínas relacionadas estructuralmente que incluye a la **insulina**, la relaxina y el **IGF-II**. Todas ellos se expresan de forma muy regulada y participan de forma esencial en procesos de diferenciación, crecimiento y desarrollo tisular.

A finales de la década de los 50 se describió una molécula dependiente de la **hormona de crecimiento** (*Growth Hormone* o **GH**) que estimulaba la incorporación de sulfatos en cartílago de ratas hipofisectomizadas (con el eje hipófisis-hipotálamo-hígado interrumpido). En un principio esta sustancia se denominó somatomedina-C aunque, actualmente, se la conoce como **factor de crecimiento tipo insulina, 1** (*Insulin-like Growth Factor, 1* o **IGF-I**), y se propuso como mediadora de las acciones de la GH (*Salmon, W.D. et al., 1957*). Con esto se completaba el eje hipotálamo-hipófisis-hígado encargado de regular el crecimiento corporal: en el hipotálamo se sintetiza la Hormona liberadora de la hormona del crecimiento (**GHRH** o *Growth Hormone Releasing Hormone*) que llega a la hipófisis donde provoca la liberación de GH en sangre. La GH es captada por el hígado donde promueve la síntesis y secreción de IGF-I en sangre, donde será transportado hasta los tejidos diana en los que ejercerá su

efecto trófico. Actualmente se sabe que existe síntesis de IGF-I independiente de GH en numerosos tejidos, incluido el sistema nervioso, y que en muchos casos ejerce una acción paracrina que no requiere la participación del sistema endocrino (*Hernandez-Sanchez, C. et al., 1995*).

Se sabe que el IGF-I participa en procesos de **proliferación**, **diferenciación** y **supervivencia** celular en gran número de tejidos tanto en el desarrollo como en el individuo adulto (*de Pablo, F. et al., 1995*). Para producir su acción biológica es necesaria la participación de varios tipos de moléculas con funciones diversas: proteínas transportadoras, receptores de membrana y un complejo sistema de segundos mensajeros.

### 1.2.1. Factores de Crecimiento de tipo Insulina: IGF-I e IGF-II.

Como hemos visto el IGF-I y el IGF-II (**IGFs**) son factores de crecimiento peptídicos estructuralmente relacionados con la insulina (*Daughaday, W.H. et al., 1989*). El IGF-I es un polipéptido de cadena sencilla, de 7,5 kDa de peso molecular, compuesto de 70 aminoácidos. Presenta un 70% de homología de secuencia con la molécula de la proinsulina, un 49% con la insulina y un 65% con el IGF-II (*Rinderknecht, E. et al., 1978*). Su alta homología estructural hace pensar que los IGFs y la insulina han derivado de una molécula ancestral común. Su estructura está muy conservada en la naturaleza ya que todos los IGFs de mamíferos contienen el mismo número de aminoácidos y el número de sustituciones es relativamente bajo (*Shimatsu, A. et al. 1987*).

Ambos IGFs se expresan, tanto en el **desarrollo** como en la **vida adulta**, en gran variedad de tejidos entre los que se incluyen músculo, pulmón, hígado, riñones y cerebro (*Binoux, M., 1995*). Dentro del sistema nervioso los IGFs y sus receptores se expresan en gran cantidad durante el **desarrollo embrionario** lo que sugiere un importante papel de estos factores durante los procesos de diferenciación neuronal, sinaptogénesis y mielinización (*Feldman, E. L. et al.,*

1997; Sara, V.R. *et al.*, 1990). Postnatalmente se produce una disminución de su expresión aunque en edades adultas ambos IGFs están presentes en el sistema nervioso central.

### 1.2.2. Proteínas transportadoras (BPs).

Las acciones biológicas de los IGFs, pero no las de la insulina, están moduladas por una familia de, al menos, seis **proteínas transportadoras** (*IGF-binding proteins* o **IGFBPs**), las cuales modulan la disponibilidad de los IGFs y regulan la interacción con sus receptores (Clemmons, D.R. *et al.*, 1995). Prácticamente todo el IGF-I presente en el torrente circulatorio y en el espacio extracelular se encuentra unido a proteínas transportadoras. De esta forma el péptido es protegido de la degradación proteica, y se prolonga su vida media desde unos 10 minutos en forma libre a unas 5-6 horas en forma unida. En el suero sanguíneo el 90% del IGF-I circula unido a la IGFBP-3 y a otra proteína (la llamada subunidad ácido lábil), formando un complejo trimérico de elevado peso molecular (unos 150 kDa) que no puede abandonar el torrente circulatorio. El resto del IGF-I circula unido a las otras IGFBPs (principalmente IGFBP-1, 2 y 4) formando complejos más pequeños (30-40 kDa) capaces de atravesar el endotelio capilar (Bar, R.S. *et al.*, 1990). Dentro del sistema nervioso adulto la proteína más abundante es la IGFBP-2 (Ocrant, I. *et al.*, 1990).

Al margen de su función protectora, estas proteínas modulan también la interacción del IGF-I con su receptor, potenciando (Jones, J.I. *et al.*, 1995; Jones, J.I. *et al.*, 1993) o inhibiendo su acción (LaTour, D. *et al.*, 1990) e, incluso, hay datos que sugieren que las IGFBPs producen efectos directos, independientes de su unión a los IGFs. Se ha visto, por ejemplo, que tanto la IGFBP-1 como la BP-2 poseen secuencias de reconocimiento de receptores de integrinas (Jones, J.I. *et al.*, 1993b) y que la IGFBP-3 y la BP-5 son capaces de unirse a moléculas de superficie celular y de matriz extracelular (Jones, J.I. *et al.*, 1993a).

### 1.2.3. Receptores de membrana

Las acciones biológicas de la insulina y de los IGFs están mediadas por receptores específicos situados en la membrana plasmática. En el sistema nervioso aparecen, al menos, cuatro tipos distintos de receptores de IGFs:

- receptor de IGF-I (receptor de IGF de tipo I)
- receptor de IGF-II (receptor de IGF de tipo II)
- receptor de insulina
- receptor híbrido de insulina e IGF-I

Todos estos receptores están relacionados estructuralmente aunque es el **receptor de IGF-I** el que media la mayoría de las acciones biológicas del IGF-I. Se trata de un receptor con actividad tirosín-quinasa intrínseca. Presenta alta homología estructural con el receptor de insulina (*Froech, E.R. et al., 1985*) y, al igual que éste, es una glicoproteína de membrana compuesta por dos subunidades  $\alpha$  extracelulares de 115 kDa y dos subunidades  $\beta$  intracelulares de 95 kDa. Ambos tipos de subunidades están unidas por puentes disulfuro, formando un complejo funcional heterotetramérico (2 subunidades  $\alpha$ , 2 subunidades  $\beta$ ) con gran abundancia de residuos N-acetil-glucosamina (*LeRoith, D. et al. 1995*).

Cuando la molécula de IGF-I se une a la subunidad  $\alpha$  del receptor provoca, a través del dominio tirosín-quinasa de la subunidad  $\beta$ , la autofosforilación de la subunidad  $\beta$  y la fosforilación de una serie de sustratos citoplasmáticos específicos, lo que inicia una compleja cascada de señalización intracelular. Debido a su gran homología estructural, tanto el receptor de IGF-I como el de la insulina, presentan activación cruzada con ambos ligandos (IGF-I e Insulina) aunque la afinidad por su ligando específico es muy superior.

El receptor de IGF-II, por su parte, actúa también como receptor independiente de cationes de la manosa-6-fosfato (**M6P**). Aunque el receptor de IGF-I es el mediador primario de la mayoría de las acciones del IGF-I, los

receptores de insulina e IGF-II también pueden mediar algunos de sus efectos. Recientemente se ha descrito la existencia de un receptor híbrido de insulina e IGF-I (**insulina-IGF-I**) (Raizada, M.K. et al., 1993) y un receptor huérfano relacionado con el receptor de la insulina (*Orphan Insulin Receptor-Related receptor*, **IRR**) (Mathi, S. K. et al., 1995), lo que añade más complejidad al sistema de los IGFs.

En general los receptores de IGFs presentes en el sistema nervioso central se expresan de forma constitutiva aunque su número puede ser modulado por distintos factores como son el propio IGF-I o las hormonas tiroideas (Werner, H. et al., 1995).

#### 1.2.4. Ruta de señalización intracelular.

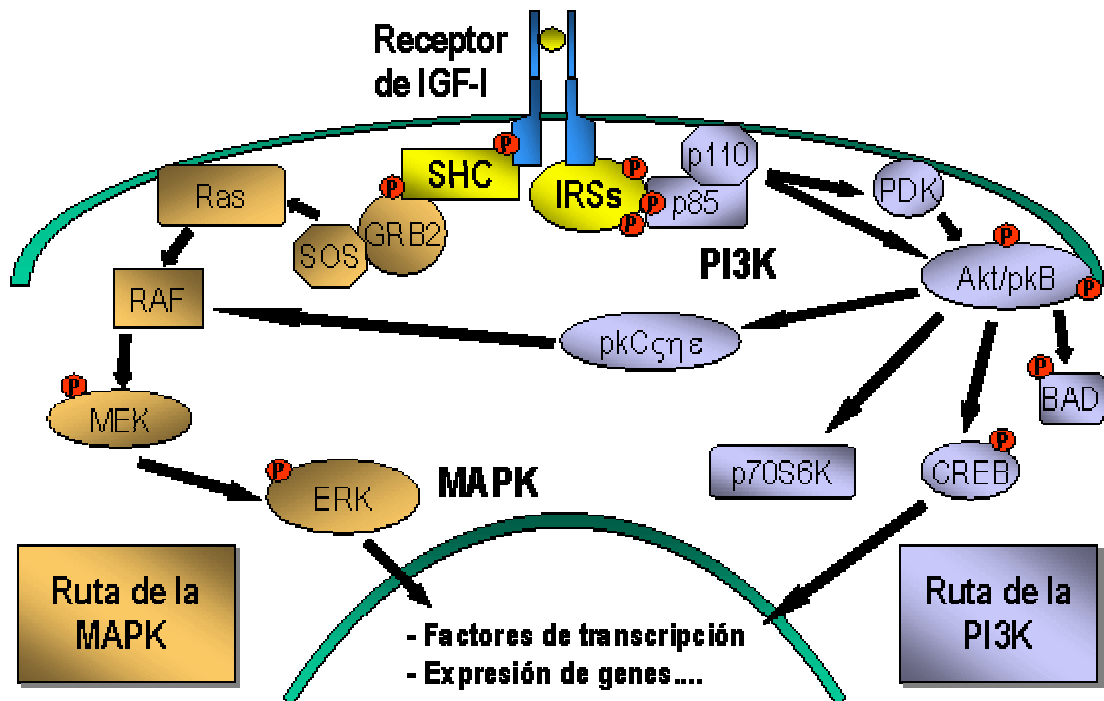
Hasta donde se sabe, la ruta de señalización intracelular del IGF-I es común con la ruta de la insulina aunque sus efectos finales difieren. Tras la unión del IGF-I a la subunidad alfa de su receptor se produce una autofosforilación de la porción citoplásmica de la subunidad beta del propio receptor y una fosforilación en tirosina una serie de proteínas, entre las que destacan los **sustratos del receptor de insulina** (*Insulin Receptor Substrates* o **IRSs**) y la proteína **SHC**. Los IRSs más conocidos son el IRS-1 y el IRS-2. El IRS-1 está muy conservado en toda las especies y presenta, al menos, 21 sitios potenciales de fosforilación en tirosina, los cuales crean sitios de unión a proteínas con dominios SH2 (*Src Homology-2*, dominios homólogos a Src, tipo 2) como la subunidad p85 de la PI3K, GRB2 (*Growth Factor Receptor Bound-2*), syp, Nck y Crk.

Tanto el IRS-1 como la proteína SHC, inician varias cascadas de señalización intracelular (ver introducción, figura 1) que pueden ser agrupadas en dos vías principales:

- la vía de la **PI3-Quinasa** (Phosphatidy-Inositol-3 Kinase, **PI3K**): se piensa que esta ruta está implicada, principalmente, en procesos metabólicos, de crecimiento celular y antiapoptóticos (*Avruch, J., 1998; Combettes-Souverein, M. et al., 1998; Peruzzi, F. et al., 1999*). El receptor de IGF-I fosforila al IRS-1, activándolo. El IRS-1 interacciona con la subunidad p85 (subunidad reguladora de la PI3K de 85 kDa) que activa a la subunidad p110 (subunidad catalítica de la PI3K de 110 kDa), y produce la formación de derivados del PIP<sub>2</sub> con los que interacciona la serín/treonín quinasa **PKB** (o Akt), que se activa y modula la función de otras proteínas. Estos derivados del PIP<sub>2</sub> también provocan la activación de algunas isoformas de la **PKC** distintas a las clásicas (PKC $\epsilon$ , $\eta$ , $\xi$ ).
- la vía de la **MAP-Quinasa** (Mitogen-Activated Protein Kinase, **MAPK**): se piensa que esta vía está implicada, principalmente, en procesos de mitogénesis y diferenciación celular (*Avruch, J., 1998; Cobb, M. H. et al., 1995*). La fosforilación de SHC por el receptor de IGF-I induce la activación de la GTPasa **Ras**. Ras induce el anclaje a la membrana y la activación de la serín/treonín quinasa **Raf** que, a su vez, conduce a la activación de otra serie de proteínas como son las MAP-quinasa-quinasas (**MEKs**), las MAPquinasas (**ERKs**), otras proteín-quinasas, factores de transcripción, etc.

Ambas vías no son totalmente independientes sino que presentan puntos de activación cruzada a través de la activación de mediadores intermedios.

Aunque estas son las dos vías mejor estudiadas, hay evidencias de toda otra serie de proteínas que actúan como sustratos intracelulares del receptor de IGF-I pero todavía no están bien caracterizadas.



Introducción, figura 1: Ruta de señalización intracelular del IGF-I

### 1.3. EL IGF-I EN EL SISTEMA NERVIOSO: LOCALIZACIÓN Y FUNCIONES

Tanto el IGF-I como su receptor y algunas de las BPs, se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso, pudiendo detectarse niveles muy elevados desde edades muy tempranas en áreas y tipos celulares específicos (Bondy, C.A. et al., 1992; Bondy, C.A. et al., 1991). Postnatalmente se produce una gran disminución de la expresión del IGF-I y su receptor (Werther, G.A. et al., 1990; Werner, H. et al., 1989), aunque en edades adultas sus niveles permanecen constantes en el sistema nervioso lo que sugiere que podría estar ejerciendo acciones tróficas en el cerebro adulto.

Dentro del sistema nervioso, el IGF-I está implicado en uno de los procesos clave del desarrollo neural temprano y tardío (De Pablo, F. et al., 1995)



como es la **proliferación** de células neuroepiteliales (*Lenoir, D. et al., 1983*), de precursores gliales (*Shinar, Y. et al., 1995*) y neuronales (*DiCicco-Bloom, E. et al., 1989*). Interviene también en procesos de **diferenciación** y **supervivencia** de neuronas (*Lindholm, D. et al., 1996; Torres-Alemán, I. et al., 1992*) y de células gliales (*McMorris, F.A. et al., 1988*) y participa en la **maduración** neuronal (*Torres-Alemán, I. et al., 1992; Caroni, P. et al., 1990*) y en procesos **antiapoptóticos** (*Peruzzi, F. et al., 1999*). La expresión de este factor se ve incrementada en respuesta a distintos tipos de lesión (isquemia, desmielinización, heridas traumáticas etc..) (*Yao, D.L. et al., 1995; García-Estrada, J. et al., 1992*) por lo que podría estar implicado en procesos de mielinización, reparación y **regeneración** del tejido nervioso. Se sabe también que el IGF-I participa en la modulación de la **liberación** de distintos tipos de neurotransmisores dentro del sistema nervioso (acetilcolina, dopamina, serotonina, glutamato, neuropéptido Y etc) (*Kar, S. et al., 1997; Castro-Alamancos, M. A. et al., 1993*). Se ha visto además que es capaz de inducir la **expresión** de varios tipos de **receptores** y **canales iónicos** (canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , receptores de glutamato, etc.) (*Guo, W. et al., 1997; Zona, C. et al., 1995*) así como de producir una **modulación** de las respuestas de algunos tipos de **canales iónicos** en el sistema nervioso (*Blair, L. A. et al., 1997*). En neuronas y células gliales se sabe que el IGF-I participa en acciones metabólicas diversas sobre todo en el metabolismo de la glucosa (*Binoux, M., 1995*).

### 1.3.1. Sistema IGF-I en cerebelo.

Tanto el IGF-I como su receptor y, al menos, dos tipos distintos de IGF-BPs están presentes en **zonas** y **tipos celulares** específicos dentro del cerebelo. En esta estructura la expresión del IGF-I es muy abundante durante el desarrollo y, aunque posteriormente disminuye, los niveles de IGF-I permanecen elevados durante toda la vida adulta (*Torres-Aleman, I. et al., 1994*). Se han

podido detectar mediante hibridación “*in situ*” grandes cantidades de ARNm del IGF-I tanto en cerebelo como en centros relacionados con la corteza cerebelar como son la oliva inferior, el núcleo vestibular medial, el núcleo reticular, los núcleos profundos y el núcleo rojo (Bondy, C. A., 1991).

Dentro del cerebelo se ha visto que las **células de Purkinje** producen **IGF-I**. Una gran parte del IGF-I que contiene el cerebelo adulto es liberado por las fibras trepadoras aferentes procedentes del núcleo de la oliva inferior. Este núcleo expresa IGF-I que se transporta ortógradamente por los axones de estas células (las fibras trepadoras) y se libera en la corteza cerebelar (Nieto-Bona, M. P. et al., 1993). Se ha visto que las lesiones quirúrgicas y químicas de la vía olivocerebelar producen un drástico descenso de los niveles de IGF-I en la corteza cerebelar (Torres-Aleman, I. et al., 1991).

En el caso del **receptor del IGF-I**, mediante estudios de microscopía electrónica realizados en ratas adultas se ha podido detectar su presencia tanto en las dendritas y espinas dendríticas como en el soma de las células de Purkinje de ratas adultas. También se ha detectado inmunoreactividad en los núcleos de la oliva inferior (origen de las fibras trepadoras) y en las células en cesto y las células estrelladas. Tanto los terminales de los axones de las células de la oliva inferior como los axones de las células granulares (fibras paralelas) son negativos aunque aparece inmunoreactividad para el receptor en los terminales de fibras próximas a los somas de las células de Purkinje. El receptor de IGF-I también se localiza en los terminales de las fibras musgosas que establecen sinapsis con las células granulares que, sin embargo, no poseen receptor de IGF-I en el adulto aunque sí en edades tempranas (Garcia-Segura, L. M. et al., 1997).

Dentro del cerebelo el IGF-I ejerce gran cantidad de **efectos tróficos** y **neuromoduladores** principalmente sobre las células de Purkinje (Torres-Alemán, I. et al., 1994; Castro-Alamancos, M.A. et al., 1993; Torres-Alemán, I. et al., 1992). Se piensa que sus efectos en el cerebelo dependen tanto del tipo celular como de la fase vital en la que se encuentren las células, constituyendo, principalmente, una señal mitogénica para glioblastos, una señal diferenciadora

en células postmitóticas o una señal de mantenimiento y supervivencia en células adultas (*Torres-Aleman, I. et al., 1998; Torres-Aleman, I. et al., 1994*). En cerebelo adulto se han encontrado varios parámetros que son dependientes de los niveles normales de IGF-I entre los que destacan los niveles de calbindina y el tamaño de las espinas dendríticas de las células de Purkinje (*Nieto-Bona, M. P. et al., 1997; Nieto-Bona, M. P. et al., 1995*) y el aprendizaje de ciertas tareas motoras en las que está implicado el cerebelo (*Castro Alamancos, M. A. et al., 1994*). Todo esto sugiere que el IGF-I está ejerciendo acciones tróficas en el cerebelo tanto en el desarrollo como en el individuo adulto.

## 2. RECEPTORES DE GLUTAMATO

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central de vertebrados. La primera demostración de que el glutamato podía actuar como un agente excitador se remonta a los años 50 cuando se vio que una inyección directa de glutamato monosódico en el cerebro inducía la generación de espigas (*Hayashi T., 1954*) y que su aplicación en corteza cerebral causaba despolarización masiva (*Van Harreveld, A., 1959*).

### 2.1. FUNCIONES DEL GLUTAMATO EN EL SISTEMA NERVIOSO.

Dentro del sistema nervioso central el glutamato no se limita a mediar la neurotransmisión excitatoria sino que presenta un gran número de funciones adicionales (*Michaelis, E.K., 1998*):

- Actúa como neurotransmisor excitador de acción rápida.
- Participa en la inducción y mantenimiento de cambios a medio y largo plazo en la excitabilidad neuronal (**plasticidad sináptica**), asociados con procesos de aprendizaje y memoria.
- Actúa como estímulo quimiotáctico durante la sinaptogénesis y el desarrollo embrionario.
- Actúa como desencadenante de procesos de migración neuronal.
- Modula el crecimiento axonal y la formación de sinapsis.
- Promueve la supervivencia de ciertas poblaciones neuronales.
- Produce cambios en la actividad metabólica, la expresión génica y la síntesis de proteínas.
- Presenta un papel destacado en procesos neurodegenerativos.

## 2.2. TIPOS DE RECEPTORES DE GLUTAMATO.

El glutamato ejerce sus acciones a través de varias clases de receptores que pueden ser diferenciados no sólo molecularmente sino también en función de sus características farmacológicas y electrofisiológicas (*Michaelis, E.K., 1998; Ozawa, S. et al., 1998*).

De forma general, los receptores de glutamato se clasifican en:

- **Receptores ionotrópicos:** forman un canal iónico activado por ligando. Su activación conlleva un incremento en la permeabilidad de la membrana celular a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , fundamentalmente. En base a sus propiedades farmacológicas, se pueden dividir en tres clases:
  - Receptores tipo **AMPA** (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico).
  - Receptores tipo **Kainato** (ácido kaínico).
  - Receptores tipo **NMDA** (N-metil-D-aspartato).
- **Receptores metabotrópicos:** están acoplados, a través de la activación de proteínas G, a sistemas de segundos mensajeros con efectos funcionales diversos.

Clase	Tipo	Agonista	Antagonista
<b>Ionotrópicos</b>	<b>AMPA</b>	AMPA	CNQX / GYKI
	<b>Kainato</b>	Kainato	CNQX
	<b>NMDA</b>	NMDA	D-APV
<b>Metabotrópicos</b>	<b>Tipo I</b>	DHPG	MCPG
	<b>Tipo II</b>	DCG-IV	MCCG
	<b>Tipo III</b>	L-AP4	MAP4

**Tabla 1:** clasificación de los receptores de glutamato en función de sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas.

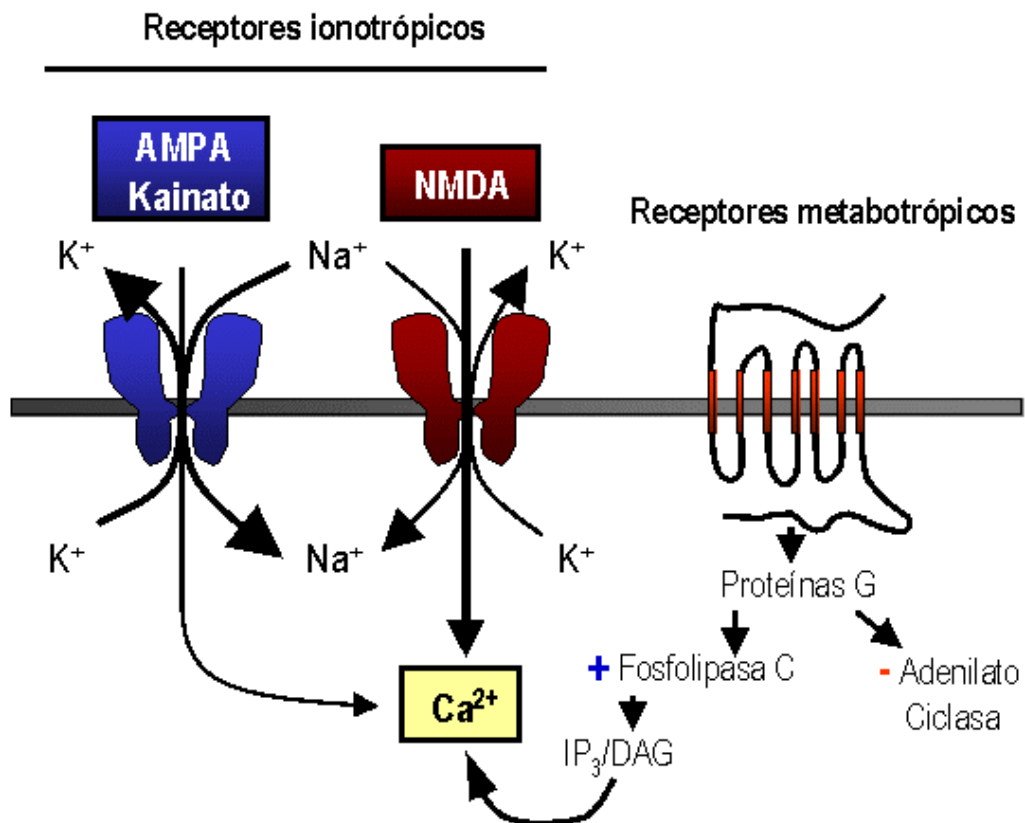
### 2.2.1. Estructura molecular de los receptores de glutamato.

El tamaño de las proteínas que forman las subunidades de los receptores de glutamato varía entre 95 y 163 kDa, un tamaño considerablemente mayor que el de las proteínas que forman los receptores de otros tipos de neurotransmisores:

- **Receptores ionotrópicos:** son receptores pentaméricos formados por la combinación de distintas subunidades cada una de ellas con 4 dominios transmembrana (de M1 a M4). Poseen una gran región amino-terminal (**N-terminal**) extracelular implicada en la unión con el ligando y una gran región carboxi-terminal (**C-terminal**) intracelular con función reguladora. Recientemente se ha descubierto que el

dominio M2 no atraviesa completamente la membrana sino que hace un giro dentro de ella.

- **Receptores metabotrópicos:** son receptores formados por una sola subunidad que presenta 7 dominios transmembrana (de M1 a M7). Al igual que en el caso de los receptores ionotrópicos, también presentan un gran dominio N-terminal extracelular implicado en la unión al ligando, y un dominio C-terminal intracelular con función reguladora.



Introducción, figura 2: Tipos de receptores de glutamato

### 2.2.2. Receptores de tipo AMPA.

Su nombre deriva de su principal agonista, el ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (**AMPA**). Estos receptores median la mayor parte de la neurotransmisión excitatoria **rápida** en el sistema nervioso central de mamíferos. Se caracterizan, por lo tanto, por tener una rápida activación y una rápida desensibilización (*Michaelis, E.K., 1998; Seeburg, P. H., 1997; Bettler, B. et al., 1995*).

Son receptores pentaméricos que forman un canal iónico permeable, principalmente, a Na<sup>+</sup> y a K<sup>+</sup>, aunque, algunos subtipos (los que no contienen GluR2), son permeables también a Ca<sup>2+</sup>.

Se forman por la combinación de cuatro tipos de subunidades (**GluR1**, **GluR2**, **GluR3** y **GluR4**), con tamaños comprendidos entre 96 y 101 kDa.

Combinación de subunidades	Tipo de receptor
Homómeros de <b>GluR1</b> , <b>GluR2</b> , <b>GluR3</b> o <b>GluR4</b>	Receptor <b>funcional</b>
Heterómeros de <b>GluR1</b> , <b>GluR2</b> , <b>GluR3</b> o <b>GluR4</b>	Receptor <b>funcional</b>

**Tabla 2:** Posibles combinaciones de subunidades de los receptores AMPA.

La subunidad GluR2 sufre un proceso de edición post-transcripcional en la molécula de ARNm que provoca un cambio en la proteína de una Glutamina



(Q) por una Arginina (R) (Ozawa, S. *et al.*, 1998; Bettler, B. *et al.*, 1995). En el cerebro se piensa que, prácticamente, todo el GluR2 está editado. Debido a este cambio se altera la permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor cuando la subunidad GluR2-editada está presente:

- los homómeros y heterómeros de GluR1, GluR3 y GluR4 presentan una alta permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ .
- los homómeros de GluR2-editado y los heterómeros de GluR2-editado con cualquiera de las otras subunidades presentan una baja permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  y una relación corriente/voltaje (I/V) lineal. Se piensa que esta es la forma neuronal predominante de los receptores AMPA en el cerebro.

Debido a un proceso de lectura alternativa del mRNA que se produce entre los dominios transmembrana 3 y 4, se originan dos formas: la forma *flip* (que aparece tanto pre como postnatalmente) y la forma *flop* (postnatal). Ambas formas difieren en sus propiedades farmacológicas y cinéticas (Sommer, B. *et al.*, 1990).

Tanto los receptores de AMPA como los de Kainato presentan activación cruzada por sus respectivos ligandos. Los receptores de AMPA son activados por el Kainato con una alta afinidad, aunque menor que la del AMPA y la del glutamato (su ligando fisiológico). Además el Kainato no produce desensibilización de los receptores de AMPA.

### 2.2.3. Receptores de tipo Kainato.

Su nombre procede de su principal agonista, el ácido kaínico. Al igual que los receptores de AMPA, los receptores de Kainato se caracterizan por tener una rápida activación aunque, en el cerebro, se piensa que la mayoría no presenta desensibilización. Su papel funcional es poco conocido y su participación en la

transmisión sináptica es objeto de debate (*Rodríguez-Moreno, A. et al., 1998; Lerma, J. et al., 1997*).

Son receptores pentaméricos que forman un canal iónico permeable, fundamentalmente, a  $\text{Na}^+$  y a  $\text{K}^+$  aunque algunos subtipos también son permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  (*Michaelis, E.K., 1998; Ozawa, S. et al., 1998; Bettler, B. et al., 1995*).

Se forman por la combinación de cinco tipos de subunidades (**GluR5**, **GluR6**, **GluR7**, **KA1** y **KA2**), con tamaños comprendidos entre 93 y 109 kDa.

Combinación de subunidades	Tipo de receptor
Homómeros de <b>GluR5</b> o <b>GluR6</b>	Receptor <b>funcional</b>
Homómeros de <b>GluR7</b> , <b>KA1</b> o <b>KA2</b>	Receptor <b>no funcional</b>
Heterómeros de <b>GluR5</b> o <b>GluR6</b> con cualquiera de las otras subunidades ( <b>GluR7</b> , <b>KA1</b> o <b>KA2</b> ).	Receptor <b>funcional</b> con propiedades semejantes al receptor nativo de Kainato.

**Tabla 3:** Posibles combinaciones de subunidades de los receptores de Kainato.

De forma similar a la subunidad GluR2 del receptor de AMPA, las subunidades GluR5 y GluR6 sufren un proceso de edición post-transcripcional en la molécula de ARN que provoca un cambio en la proteína de una Glutamina (Q) por una Arginina (R). GluR6 presenta, además, dos sitios adicionales de edición. La permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ , sin embargo, no varía con la edición de GluR6 aunque sí varían las propiedades rectificadoras del canal (*Michaelis, E.K., 1998; Bettler, B. et al., 1995*).

Ambos tipos de receptores (AMPA y Kainato) presentan activación cruzada por sus respectivos ligandos. Los receptores de Kainato son activados también por AMPA aunque con mucha menor afinidad que la activación por Kainato o por glutamato (ligando fisiológico).

### 2.2.4. Receptores de tipo NMDA.

Su nombre proviene del N-metil-D-aspartato (NMDA), su agonista principal. Estos receptores se caracterizan por tener una respuesta lenta, con una desensibilización también lenta. Esta lentitud de la respuesta se debe a que, a concentraciones fisiológicas y estando la célula en su potencial de reposo, el canal está bloqueado en la región transmembrana por una molécula de  $Mg^{2+}$ . Se trata de un bloqueo voltaje-dependiente que se elimina por despolarización, generalmente provocada por la activación de los receptores AMPA/Kainato (*Michaelis, E.K., 1998; Mori, H. et al., 1995*).

Estos receptores presentan varios sitios de regulación, entre ellos un sitio de unión a glicina con alta afinidad y un sitio de unión a  $Zn^{2+}$ . La glicina aumenta la activación del receptor de forma dependiente de dosis y es un requisito importante para su activación.

Los receptores NMDA presentan una alta permeabilidad a  $Ca^{2+}$ , aunque también son permeables a  $Na^{+}$  y  $K^{+}$ .

Son receptores pentaméricos que se forman por la combinación de dos tipos de subunidades (**NR1** y **NR2**), con tamaños comprendidos entre 103 y 163 kDa. En ambos tipos de subunidades existen algunas variantes de lectura del ARNm que dan lugar a distintas isoformas (*Ozawa, S. et al., 1998 Mori, H. et al., 1995*).

Combinación de subunidades	Tipo de receptor
Homómeros de NR1 <sub>a-h</sub>	Receptor <b>funcional</b>
Homómeros de NR2 <sub>A-D</sub>	Receptor <b>no funcional</b>
Heterómeros de NR1 <sub>a-h</sub> / NR2 <sub>A-D</sub>	Receptor <b>funcional</b> con propiedades semejantes al receptor nativo de NMDA

**Tabla 4:** Posibles combinaciones de subunidades de los receptores de NMDA.

Según la combinación de las subunidades NR1 y NR2 variará la permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor.

#### 2.2.5. Receptores metabotrópicos de glutamato

A diferencia de los receptores ionotrópicos, estos receptores no forman canales iónicos sino que están acoplados a un sistema de segundos mensajeros a través de la activación de proteínas G. Sus acciones son más lentas y duraderas (de segundos a minutos) que las de los receptores ionotrópicos (Michaelis, E.K., 1998; Pin, J. P. et al., 1995).

Los receptores metabotrópicos (**mGluR**, del inglés *metabotropic Glutamate Receptors*) se localizan tanto a nivel presináptico, donde se han

relacionado con la modulación de las sinapsis mediante cambios en la liberación de neurotransmisor, como a nivel postsináptico, modulando canales iónicos y receptores ionotrópicos. Se piensa que están implicados en cambios en la excitabilidad neuronal, en fenómenos de plasticidad sináptica, en las acciones tóxicas del glutamato (tras isquemia, anoxia...), etc.

Están constituidos por una única subunidad proteica con 7 dominios transmembrana. Se han encontrado hasta ocho tipos de subunidades (**mGluR1**, **mGluR2**, **mGluR3**, **mGluR4**, **mGluR5**, **mGluR6**, **mGluR7** y **mGluR8**) con tamaños comprendidos entre 95 y 133 kDa. En algunas de las subunidades (mGluR1, mGluR4 y mGluR5) aparecen variables de edición.

Subunidad	Tipo receptor	Sistema de traducción de señal
<b>mGluR1<sub>a-c</sub></b> <b>mGluR5<sub>a-b</sub></b>	<b>Tipo I</b>	Activación de <b>Fosfolipasa C</b>
<b>mGluR2</b> <b>mGluR3</b>	<b>Tipo II</b>	Inhibición de <b>Adenilato Ciclasa</b>
<b>mGluR4<sub>a-b</sub></b> <b>mGluR6</b> <b>mGluR7</b> <b>mGluR8</b>	<b>Tipo III</b>	Inhibición de <b>Adenilato Ciclasa</b>

**Tabla 5:** Clasificación de los receptores metabotrópicos de glutamato.

Todos los mGluR están acoplados a un sistema de proteínas G. Los mGluR del grupo I estimulan una fosfolipasa C y provocan un aumento de la concentración intracelular de inositol trifosfato (**IP3**) y de diacilglicerol (**DAG**),

estimulando gran número de procesos mediados por estos dos mensajeros intracelulares.

Los mGluRs de los grupos II y III están acoplados a la adenilato ciclasa produciendo su inhibición, por lo que causan una disminución del AMP-cíclico (**AMPc**) intracelular y de aquellos procesos mediados por este segundo mensajero (actividad de PKA, por ejemplo). Se ha descrito, además, que pueden estar acoplados a canales de  $\text{Ca}^{2+}$  impidiendo su apertura.

### 2.3. RECEPTORES DE GLUTAMATO Y PLASTICIDAD SINÁPTICA

Los receptores de glutamato median la mayor parte de la transmisión excitatoria rápida del sistema nervioso y son esenciales para la inducción y mantenimiento de varias formas de plasticidad sináptica (*Bortolotto, Z. A. et al., 1999a; Zamanillo, D. et al., 1999; Bortolotto, Z. A. et al., 1999b; Roche, K. W. et al., 1994*). Mediante los procesos de plasticidad el cerebro se adapta a las condiciones del entorno en función de la información que recibe. Esta plasticidad se expresa, entre otras formas, como una variación en la eficacia de la transmisión del mensaje nervioso debida a cambios, más o menos duraderos, en la eficacia de una conexión sináptica en función de la actividad de las neuronas situadas a uno y otro lado de la sinapsis.

Hay gran cantidad de evidencias que apoyan la hipótesis de que los cambios a medio y largo plazo en la eficacia de las sinapsis están en la base de los procesos de aprendizaje y memoria. La capacidad del cerebro de modificar su funcionalidad en respuesta a la experiencia proporciona al individuo la capacidad de aprender y recordar. El **aprendizaje** se puede definir como el conjunto de representaciones internas sobre el entorno generadas por la experiencia individual. El término **memoria** hace referencia al conjunto de mecanismos mediante los cuales se almacenan y retienen dichas representaciones internas en el tiempo. Ambos procesos están estrechamente

ligados y, por definición, no hay aprendizaje sin memoria ni memoria sin aprendizaje, aunque éste sea de naturaleza muy elemental.

Las primeras hipótesis sobre el almacenamiento de la memoria en el cerebro fueron enunciadas por **Tanzi y Ramón y Cajal**, el cual, durante su conferencia de apertura de British Royal Society en 1884, sugirió que el aprendizaje podría provocar cambios morfológicos permanentes en las conexiones sinápticas y que dichos cambios podrían servir como mecanismo de memoria. En 1949, el psicólogo canadiense **Donald Hebb** en su libro "*The organization of behavior*" propuso que la información se almacena en el cerebro de los mamíferos en forma de conexiones sinápticas reforzadas en aquellas neuronas activas durante el aprendizaje. De acuerdo con esta hipótesis, la información se almacena en el cerebro gracias a la plasticidad de las sinapsis.

En la mayor parte de los procesos de plasticidad sináptica están implicados, de un modo u otro, los receptores de glutamato. Dos de los fenómenos más conocidos de plasticidad son la potenciación duradera o LTP y la depresión duradera o LTD.

El fenómeno de la **potenciación duradera** (en inglés, *Long Term Potentiation* o **LTP**) es un modelo de plasticidad sináptica en el que se produce un aumento duradero de la eficacia de la transmisión sináptica excitatoria en ciertas sinapsis glutamatérgicas. Uno de los modelos más estudiados es la potenciación duradera de la transmisión sináptica excitatoria entre las células de la capa CA3 y la capa CA1 del hipocampo de la rata por estimulación tetánica de alta frecuencia (100 Hz). Se ha visto que es necesaria la activación del receptor NMDA de glutamato para inducir la LTP, que se expresa como un incremento de la transmisión sináptica excitatoria mediada por los receptores de AMPA (*Barria, A. et al., 1997; Bliss, T.V.P. et al., 1993*).

El fenómeno de la **depresión duradera** (en inglés, *Long Term Depression* o **LTD**) es otro modelo de plasticidad sináptica que también es dependiente de los receptores de glutamato. En el **cerebelo** se ha visto que para la inducción de LTD es necesaria la activación simultánea de los mGluRs y de

los receptores tipo AMPA de la célula de Purkinje, produciéndose una reducción en la sensibilidad de estos últimos (*Linden, D.J., 1994; Ito, M. et al., 1982*). En el **hipocampo** se ha observado un tipo de LTD que se genera por largo periodos de estimulación a baja frecuencia (1 Hz) y que es dependiente de activación de los receptores NMDA y en la que, de nuevo, se produce una disminución de la transmisión sináptica mediada por los receptores de AMPA (*Lee, H. K. et al., 1998*).

En general, la **eficacia de una conexión sináptica** entre dos neuronas depende de una serie de parámetros entre los que se incluyen:

- el número de **contactos sinápticos** que hay entre las dos neuronas.
- la cantidad de **neurotransmisor** que se libera en la célula presináptica.
- el número de **receptores** situados en la región sináptica de la célula postsináptica.
- el **estado funcional** de dichos receptores.

Cualquier cambio en alguno de estos parámetros produce una modificación en la transmisión sináptica. El **estado funcional de un receptor** se puede modular por varios mecanismos entre los que destacan la modificación de su estado de **fosforilación** y la modulación de **interacciones** con otras proteínas e iones. Por su parte, la **disponibilidad de receptores** en la célula postsináptica puede estar mediada por procesos de **endocitosis/exocitosis** de receptores funcionales y/o por **cambios morfológicos** a nivel de los contactos sinápticos.



### 2.3.1. Modulación de los receptores de glutamato por procesos de fosforilación/desfosforilación

Los procesos de fosforilación/desfosforilación constituyen uno de los principales mecanismos de modulación de la actividad de los receptores de glutamato (*Raymond, L. A. et al., 1994*). A través de la fosforilación se produce una **modificación covalente** de la estructura del canal mediante la incorporación de un grupo fosfato cargado eléctricamente en un residuo de **serina (Ser)**, **treonina (Thr)** o **tirosina (Tyr)**. Esta modificación estructural puede causar una **regulación de la actividad** del receptor. Dicha reacción de fosforilación puede ser realizada por una gran cantidad de **proteín-quinasas**: **proteín-quinasa A (PKA)**, **proteín-quinasa C (PKC)**, etc. (*Roche, K. W. et al., 1994*);. *Smart, T. G., 1997*):

Como hemos visto, la expresión de la plasticidad sináptica está mediada en parte por la modulación de la función de los receptores de glutamato. En distintas áreas cerebrales se ha observado que los fenómenos de plasticidad son dependientes de la actividad de quinasas y fosfatasas, lo que apoya la hipótesis de que los mecanismos de fosforilación directa de los receptores de glutamato podrían estar mediando ciertas formas de plasticidad sináptica entre las que se incluyen los fenómenos de la **LTP** (*Bliss, T.V.P. et al., 1993; O'Dell, T.J. et al., 1991*) y la **LTD** (*Ito, M. et al., 1992; Linden, D.J. et al., 1991*).

#### **Receptores de NMDA**

Se ha visto que su actividad puede ser regulada por una amplia variedad de quinasas que inducen una fosforilación de varias de sus subunidades. Se sabe, por ejemplo, que las tirosín-quinasas **Src** y **Fyn** producen una modulación positiva de las subunidades NR1 y NR2A mediante fosforilación del dominio Carboxi-terminal (*Tezuka, T. et al., 1999, Salter, M. W., 1998, Kohr, G. et al., 1996*). En el caso de las serín/treonín quinasas, se ha visto que el receptor

NMDA **no** es regulado por **PKA** pero es positivamente regulado por **PKC** (*Raymond, L. A. et al., 1994*).

Del mismo modo se ha visto que la **desfosforilación** de las subunidades del receptor NMDA por activación de **fosfatasas** también produce una modulación de su actividad. Se ha podido comprobar que la activación de las fosfatasas PP1 y/o PP2A por efecto del PDGF induce una depresión del receptor NMDA, produciendo una reducción en la probabilidad de apertura del canal (*Lei, S. et al., 1999*).

### Receptores no NMDA

Hay multitud de datos que sugieren que, al igual que en el caso de los receptores NMDA, la fosforilación directa de los receptores de AMPA y de Kainato también podría regular su función.

En el caso de los receptores de **AMPA** se ha visto que sus diferentes subunidades pueden ser **fosforiladas** por varias proteínas quinasas como la **PKC**, la **PKA** y la **CaM-quinasa** (proteína-quinasa dependiente de calcio y calmodulina) y que, como resultado de esta fosforilación, se produce una modulación de la actividad del receptor (*Carvalho, A. L. et al., 1999, Roche, K. W. et al., 1996*). También se ha visto que la **desfosforilación** de sitios específicos en las subunidades de estos receptores puede modular su función de forma opuesta a la fosforilación de esos mismos sitios por efecto de varias quinasas (PKA y CaM-quinasa) y que, estos cambios, podrían estar en la base de los fenómenos de LTD y LTP en hipocampo (*Lee, H. K. et al., 2000*).

Aunque de los receptores de **Kainato** se sabe mucho menos, se ha podido comprobar que su actividad también es susceptible de ser modulada por fosforilación de sus subunidades. Por ejemplo en células HEK-293 se ha visto que la **PKA** fosforila a la subunidad GluR6 en residuos de serina y produce una potenciación de las corrientes activadas por el kainato (*Raymond, L. A. et al., 1994*).

### 2.3.2. Mecanismos de anclaje y modulación de los receptores de glutamato en la sinapsis excitatoria.

La transmisión de señal en el sistema nervioso debe ser rápida y eficaz por lo que, tanto los **receptores** para neurotransmisores como toda una serie de proteínas implicadas en la neurotransmisión y la traducción de señal, se localizan de forma **muy precisa** en los **contactos sinápticos** (*O'Brien, R. J. et al., 1998*). Se ha visto que los canales iónicos y los receptores de membrana no son entidades aisladas sino que están físicamente unidos a un gran número de elementos celulares en las áreas sinápticas formando **complejos multimoleculares**. Mediante este tipo de complejos los receptores y los canales se organizan junto a proteínas de adhesión celular, proteínas adaptadoras, segundos mensajeros y proteínas de citoesqueleto, formando una unidad física que integra gran número de posibles vías de señalización y permite una asociación directa con el citoesqueleto (*O'Brien, R. J. et al., 1998; Kornau, H. C. et al., 1997*). Estos complejos facilitan el anclaje y localización de los receptores en sitios específicos, participan en la traducción de señal desde el receptor hacia rutas intracelulares, son responsables de fijar cerca de los receptores gran número de proteínas reguladoras que modulan su función, intervienen en los procesos de reciclaje y de modulación de la disponibilidad de receptores, etc.

Todas las subunidades de los **receptores de glutamato** presentan un dominio intracelular regulador (el Carboxi-terminal) que está implicado en la asociación de estos receptores con gran número de elementos celulares, así como en su fijación en localizaciones celulares muy precisas (los sitios de neurotransmisión) y en el anclaje en estos mismos sitios de multitud de proteínas implicadas en la regulación de su actividad (*Bolton, M. M. et al., 2000*).

### Receptores de NMDA

En la célula postsináptica los receptores NMDA están embebidos en un citoesqueleto especializado subyacente a la membrana plasmática conocido como **densidad postsináptica (DPS)**. Esta DPS está constituida por diferentes tipos de proteínas que interaccionan entre ellas y con el citoesqueleto, y que, a su vez, están asociadas a las diferentes subunidades de estos receptores, formando un complejo multimolecular. Una de los principales componentes de la DPS es la **PSD-95** (*Post Synaptic Density-95*, también llamada *SAP-90*, *Synapse Associated Protein-90*) (Tezuka, T. et al., 1999; Kornau, H. C. et al., 1995) que contiene múltiples dominios de interacción con proteínas por lo que podría estar actuando como un elemento adaptador. La PSD-95 pertenece a una familia cada vez más amplia de proteínas con una estructura similar caracterizada por poseer tres **dominios PDZ** dispuestos en tandem, un **dominio SH3** (*Src-Homology-3*) y un dominio guanilato ciclasa.

En los últimos tiempos se ha avanzado mucho en el conocimiento de estos complejos multimoleculares y cada día aumenta el número de proteínas implicadas. Recientemente, empleando una técnica combinada de espectrometría de masas e inmunodetección a gran escala, se han podido identificar más de 77 proteínas asociadas con las subunidades de los receptores de NMDA (Husi, H. et al., 2000). Estas proteínas se disponen formando complejos multimoleculares y poseen funciones muy diversas, que van desde proteínas con una función estructural y adaptadora a proteínas de citoesqueleto, pasando por gran cantidad de proteínas implicadas en traducción de señal (quinasas, fosfatasas, proteínas G, etc.). Muchas de estas proteínas son nuevas y es posible que su número final sea mucho más elevado.

### Receptores de AMPA

En el caso de los receptores de tipo **AMPA** se han identificado varias proteínas que se unen específicamente al dominio C-terminal de algunas de sus subunidades y que estarían implicadas en su anclaje a la zona post-sináptica

(Dong, H. et al., 1999, Xia, J. et al., 1999). Los receptores AMPA interaccionan con otra serie de proteínas con dominios PDZ como son **GRIP** (*Glutamate Receptor Interacting Protein*) y **ABP** (*Ampa Binding Protein*), que se asocia a las subunidades 2 y 3; las proteínas **PSD-96** y **PICK1** (*Protein Kinase C Interacting Protein*) que se asocian específicamente a la subunidad GluR2 (Xia, J. et al., 1999); **SAP-97** que se une a filamentos de actina del citoesqueleto y a la subunidad GluR1 (Matus, A., 1999; Leonard, A. S. et al., 1998); la **Neurobina-I** y **Neurobina-II** (o Espinofilina) que, a través de sus dominios PDZ, se une a las subunidades del receptor AMPA y a otra serie de proteínas como son la **proteín-fosfatasa 1 (PP1)** y la **p70 S6 quinasa** (Burnett, P. E. et al., 1998; Nakanishi, H. et al., 1997). Se ha visto también que la subunidad GluR2 se une específicamente a la tirosín-quinasa **Lyn**, perteneciente a la familia de las Src-quinasas, y cuya actividad es capaz de modular (Hayashi, T. et al., 1999).

En general, muchas de estas proteínas presentan múltiples dominios de unión a proteínas (PDZ, SH2, SH3, etc.) por lo que actúan como elementos adaptadores y podrían estar participando en la regulación de la actividad de los receptores de glutamato modulando las interacciones entre diferentes proteínas, facilitando el anclaje en los sitios de neurotransmisión de proteínas con función reguladora (quinasas, fosfatasas, etc.), etc.

### 2.3.3. Modulación del número y disponibilidad de los receptores de glutamato en la membrana postsináptica

Hasta hace relativamente poco tiempo el movimiento de receptores y canales iónicos desde la membrana hacia el interior celular y viceversa estaba relacionado con procesos de recambio de receptores y con procesos de plasticidad a medio y largo plazo. Recientemente, sin embargo, se ha podido comprobar que existe un **movimiento rápido** de receptores desde la membrana plasmática que podría estar mediando **procesos rápidos de plasticidad**

**sináptica.** Sin embargo el mecanismo a través del cual se produce esta regulación rápida del número de receptores está aún por dilucidar.

La regulación de la **disponibilidad de receptores** en la membrana plasmática se puede realizar mediante dos mecanismos: un proceso de **endocitosis/exocitosis** mediante la formación de vesículas recubiertas de clatrina y/o un proceso de reorganización de la membrana postsináptica mediante cambios morfológicos producidos por **variaciones en el citoesqueleto**.

### 2.3.3.1. Proceso de Endocitosis/Exocitosis

Hay evidencias que indican que el número de receptores de glutamato situados en una determinada sinapsis no es fijo sino que está regulado de forma rápida por la actividad neuronal (*Carroll, R. C. et al., 1999*). Estos cambios rápidos en el **número de receptores** postsinápticos estarían implicados en el control de la **eficacia sináptica** (*Luscher, C. et al., 2000*). El proceso por el cual se produce esta rápida regulación no se conoce en detalle aunque el único mecanismo conocido hasta el momento para la internalización y externalización selectiva de proteínas integrales y otros componentes de la membrana plasmática es el proceso de endocitosis/excitosis mediado por vesículas recubiertas de clatrina (*Turrigiano, G. G., 2000*). Este proceso es de gran importancia en el sistema nervioso ya que a través de él se produce el reciclaje de las vesículas secretoras en los terminales sinápticos.

El proceso de la **endocitosis** se inicia con la asociación, a una zona determinada de la membrana, del llamado complejo adaptador de clatrina (*clathrin adaptor complex* o **AP2**) que sirve de molde para el ensamblaje de la clatrina. Mediante su interacción con el AP2 esta proteína recubre una porción de membrana que, progresivamente, se va haciendo mayor hasta que se invagina formando una vesícula recubierta de clatrina con un pequeño cuello en

la zona de unión a la membrana. Este cuello se corta y se forma una vesícula libre que rápidamente pierde su recubrimiento. Además del AP2 y la clatrina en los últimos años se han descrito gran cantidad de proteínas implicadas en el proceso de endocitosis como son la dinamina, la ampifisina, la endofilina, etc.

Recientemente se ha visto en cultivos de hipocampo que, tanto el AMPA como el glutamato, inducen una rápida internalización dependiente de ligando de algunas de las subunidades de los receptores de AMPA. Esta internalización es dependiente de la formación de vesículas recubiertas de clatrina lo que sugiere que se trata de un proceso de endocitosis típico (*Luscher, C. et al., 1999; Carroll, R. C. et al., 1999; Turrigiano, G. G., 2000*). Este es un proceso muy rápido y dependiente de la actividad neuronal, lo que sugiere que esta internalización/externalización de los receptores de glutamato mediante endocitosis/exocitosis podría ser responsable de algunos cambios rápidos que se producen en las sinapsis glutamatérgicas y que conducen a cambios en la eficacia de la transmisión sináptica.

### 2.3.3.2. Interacciones con el citoesqueleto

Los dos elementos fundamentales del citoesqueleto celular son los microfilamentos y los microtúbulos. Los **microfilamentos** están constituidos por polímeros de **actina**. Por su parte los **microtúbulos** se forman por polimerización de **tubulina** ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y su estabilidad está regulada por GTP,  $\text{Ca}^{2+}$  y una serie de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP1-A y MAP-2 (**MAPs**, *Microtubule Associated Proteins*) y la proteína **Tau**). Tanto los microtúbulos como los microfilamentos están implicados en numerosas funciones dentro de la célula: mantenimiento de la estructura celular, reciclaje de vesículas, anclaje de elementos celulares, procesos de división celular, etc. (*van Rossum, D. et al., 1999*).

Se sabe que la estabilidad de los microtúbulos y los microfilamentos es muy dependiente de su estado de fosforilación ya que estos componentes del citoesqueleto se polimerizan y despolimerizan de forma dinámica por efecto de diferentes quinasas y fosfatasas dando lugar a cambios morfológicos y estructurales en la célula. En el caso de la actina se comprobado además que su estado de polimerización es muy sensible a la actividad sináptica (*Fischer, M. et al., 1998*).

Se ha visto que en las espinas dendríticas los **receptores de glutamato** interaccionan, directamente o a través de proteínas adaptadoras, con elementos de **citoesqueleto** (*Fischer, M. et al., 2000a*). Las **espinas dendríticas** son pequeños engrosamientos de la membrana postsináptica que conforman los contactos sinápticos en las sinapsis glutamatérgicas. En el cerebro más del 90% de las **sinapsis excitatorias** están localizadas en las espinas dendríticas en las que se concentran también grandes cantidades de actina. En estas zonas es donde se localiza la DPS y en ella encontramos todo tipo de proteínas de citoesqueleto entre las que destacan la actina, la tubulina y la MAP-2. En neuronas se han encontrado numerosas interacciones entre proteínas de citoesqueleto y proteínas de la densidad postsináptica (DPS), muchas de las cuales forman parte de los complejos multimoleculares asociados a distintos receptores.

En el caso de los **microfilamentos** se ha descrito una interacción entre la subunidad NR1 de los receptores de **NMDA** y los filamentos de actina a través de la proteína alfa-actinina-2 (*Wyszynski, M. et al., 1997*). Esto mismo hace la espectrina (llamada fodrina en cerebro) pero a través de un sitio de unión distinto al receptor de NMDA (*Wechsler, A. et al., 1998*). En células granulares de cerebelo se ha visto que la activación de estos receptores induce la despolimerización de los microfilamentos de actina (*Shorte, S. L., 1997*). En el caso del receptor de **AMPA**, en neuronas piramidales se ha visto que las agrupaciones postsinápticas de receptores son dependientes de la integridad de los microfilamentos aunque esto no ocurre en neuronas GABA-érgicas (*Allison, D. W. et al., 1998*).



Respecto a los **microtúbulos**, se ha visto que existe una unión física entre la tubulina y el dominio C-terminal de las subunidades NR1 y NR2B de los receptores de NMDA (*Wheal, H. V. et al., 1998*).

Empleando técnicas de visualización directa de neuronas vivas en rodajas de cerebro se ha podido observar recientemente que los protocolos de estimulación para producir LTP dependiente de NMDA inducen la formación de nuevas estructuras semejantes a espinas dendríticas en las dendritas. La movilidad y la relativa rapidez con la que aparecen estas estructuras sugiere que su formación se produce a través de un mecanismo dependiente de polimerización/despolimerización de filamentos de actina (*Fischer, M. et al., 1998; Fischer, M. et al., 2000b*). Se ha visto además que estas estructuras móviles se originan en respuesta a la activación del receptor de NMDA aunque posteriormente su morfología se estabiliza debido a la transmisión sináptica mediada por el receptor de AMPA (*Shi, S. H. et al., 1999*).

Todos los datos acumulados sugieren que la transmisión sináptica glutamatérgica se puede modular mediante cambios microanatómicos de los receptores de glutamato en la membrana postsináptica, modulando su anclaje al citoesqueleto subyacente. Esto provocaría la redistribución de los receptores, situándolos fuera o dentro de los sitios sinápticos y produciendo cambios en la transmisión sináptica. Las espinas dendríticas por lo tanto son estructuras dinámicas capaces de modificar su estructura en función del patrón de estimulación y estarían moduladas por la activación de los receptores de glutamato.

### 3. FACTORES TRÓFICOS Y PLASTICIDAD SINÁPTICA

#### 3.1. FACTORES TRÓFICOS COMO NEUROMODULADORES: EL IGF-I COMO NEUROMODULADOR

Aunque tradicionalmente se ha considerado a los factores neurotróficos como reguladores de procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular, hay una gran cantidad de evidencias recientes que sugieren que estos factores podrían estar modulando la actividad sináptica.

Las neurotrofinas son los factores tróficos cuyos efectos biológicos han sido más estudiados. Esta familia está compuesta por el factor de crecimiento nervioso (**NGF**, *Nerve Growth Factor*), el factor neurotrófico derivado de cerebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*, **BDNF**), y las neurotrofinas-3, 4/5 y 6 (**NT-3**, **4/5** y **6**). Ejercen sus efectos a través de sus receptores tirosín-quinasa específicos (**Trks**) y el receptor de neurotrofinas de baja afinidad, **p-75**.

La primera demostración de que las **neurotrofinas** podían estar mediando procesos de plasticidad se vio en co-cultivos de motoneuronas y médula espinal en los que el BDNF y el NT-3 producían una potenciación de la transmisión sináptica (*Lohof, A.M. et al., 1993*). Se ha visto que las neurotrofinas participan en la **sinaptogénesis**, promoviendo la maduración y el desarrollo de distintos tipos de sinapsis dentro del sistema nervioso central (*McAllister, A.K., et al., 1995; Cadbelli, R.J. et al., 1995*). Tanto la **expresión de los genes** de las neurotrofinas y sus receptores (*Gwag, B. J. et al., 1993 Bessho, Y. et al., 1993*) como su proceso de **síntesis** (*Lindholm, D. et al., 1994*) y **liberación** (*Lauterborn, J. C. et al.; Zafra, F. et al., 1990*) está regulado por la actividad neuronal. Del mismo modo las neurotrofinas regulan la **expresión** de distintos tipos de **receptores para neurotransmisores**, incluidos los receptores de **glutamato** (*Narisawa-Saito, M. et al., 1999*) e inducen la **liberación** de varios tipos de **neurotransmisores** entre los que también se incluye el **glutamato** (*Li, Y. X. et al., 1998; Numakawa, T. et al., 1999*). Muy recientemente se ha podido

comprobar que las neurotrofinas son capaces de inducir **potenciales de acción** en neuronas centrales de corteza, hipocampo y cerebelo (*Kafitz, K. W. et al., 1999*) y que son capaces de **modular la actividad** de varios tipos de **canales iónicos** (*Tanaka, T. et al., 1997; Lesser, S. S. et al., 1997*) y de **receptores** para neurotransmisores entre los que se incluyen los receptores de **glutamato** (*Balkowiec, A. et al., 2000; Song, D. K. et al., 1998*). Se ha visto también que las neurotrofinas tienen efecto sobre los fenómenos de aprendizaje y memoria en cuya base molecular estaría la modulación de los receptores de glutamato (*Levine, E.S. et al., 1995; Patterson, S. et al., 1992*).

Al igual que las neurotrofinas, el **IGF-I** cumple los dos criterios principales que debe poseer cualquier mediador de la plasticidad sináptica: su **producción** está regulada por la **actividad** neuronal y tiene potentes **efectos** sobre las propiedades de **señalización** de las neuronas sobre las que actúa. Sin embargo, a diferencia de las neurotrofinas, los efectos del IGF-I están mucho menos estudiados aunque también hay evidencias que sugieren que podría estar actuando como modulador de la actividad neuronal:

- El IGF-I promueve la **sinaptogénesis** durante el desarrollo del cerebro y modula la formación de **contactos sinápticos** en el individuo adulto: recientemente se ha visto que un bloqueo parcial de la síntesis endógena de IGF-I mediante un oligonucleótido antisentido produce cambios en los contactos sinápticos de las células de la corteza del cerebelo (*Nieto-Bona, M. P. et al., 1997*).
- La **secreción** de **IGF-I** es dependiente de **actividad**: *in vivo* se ha visto que por estimulación eléctrica de la Oliva Inferior a una frecuencia fisiológica (4-5 Hz) se produce una liberación de IGF-I en corteza cerebelar (*Castro-Alamancos, M. A. et al., 1994*).
- El IGF-I también es capaz de inducir la **expresión** de varios tipos de receptores y canales iónicos: en células granulares de cerebelo se ha visto que el IGF-I induce la expresión de receptores de glutamato de tipo AMPA y Kainato (*Zona, C. et al., 1995*). En el

músculo esquelético de la rata se ha visto que el IGF-I es capaz de inducir la expresión de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang, Z. M. *et al.*, 1999).

- Los IGFs son capaces de **modular** la **secreción** de varios tipos de neurotransmisores en el SNC: en rodajas de hipocampo y de corteza cerebral se ha visto que la liberación de acetilcolina inducida por despolarización es inhibida por IGF-I y estimulada por IGF-II (Kar, S. *et al.*, 1997). En el cerebelo, el IGF-I es capaz de inhibir *in vivo* la liberación de GABA inducida por glutamato pero no por agentes despolarizantes como las concentraciones altas de potasio (Castro-Alamancos, M. A. *et al.*, 1993).
- El IGF-I tiene un efecto **modulador** sobre las respuestas de varios **canales iónicos**: se ha visto, por ejemplo, que el IGF-I es capaz de modificar las respuestas de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes de tipo L y N presentes en las células granulares de cerebelo (Blair, L. A. *et al.*, 1997).
- El IGF-I produce cambios en el estado de **fosforilación** de ciertos canales iónicos: en músculo esquelético se produce una desfosforilación inducida por IGF-I de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Delbono, O. *et al.*, 1997).
- El IGF-I tiene un efecto sobre los procesos de **aprendizaje** y **memoria**: en cerebelo de rata adulta se ha visto que la reducción temporal de los niveles de IGF-I en corteza cerebelar debido a la inyección en Oliva Inferior de un oligonucleótido antisentido produce un bloqueo en el aprendizaje del parpadeo condicionado (en el que está implicado el cerebelo) (Castro-Alamancos, M. A. *et al.*, 1994). También se ha visto que el IGF-I produce una depresión de las respuestas de la célula de Purkinje medida como liberación de GABA, que puede ser bloqueada empleando

inhibidores del proceso de la LTD (*Castro-Alamancos, M. A. et al., 1996*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. CULTIVO DE CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO

Todos los cultivos fueron realizados a partir de cerebelos de ratas Wistar de edades comprendidas entre 7 y 9 días (P7 a P9), nacidas y criadas en el animalario del Instituto Cajal. Mediante este método obtuvimos cultivos puros en un 90% (aproximadamente) de células granulares.

Según la técnica a utilizar, las células fueron sembradas sobre diferentes soportes:

- para los experimentos de electrofisiología e inmunocitoquímica, las células se sembraron sobre **portaobjetos** de cristal de 20 y 22 mm de diámetro recubiertos con una mezcla de gelatina/polilisina (1mg/50 ml) a una densidad de 100.000 a 300.000 células por placa.
- para los experimentos de bioquímica las células se sembraron en **placas de cultivo** (Falcon; Nunc) de 60 y 100 mm de diámetro recubiertas con gelatina/polilisina a una densidad de 2 a 10 millones de células por placa respectivamente.

#### Método de cultivo de células granulares de cerebelo

- Se sacrifican los animales mediante decapitación y se esterilizan las cabezas en etanol 96°.
- Se extrae el cerebelo, se limpia de meninges, plexos y vasos y se coloca en **EBSS<sup>a</sup>** (*Earle's Balanced Salts*). El tejido se trocea mecánicamente con unas pinzas finas.
- Los trozos se mezclan con **Papaína<sup>b</sup>** y **Dnasa<sup>b</sup>** (100 u/ml) en 5 ml. de EBSS y se procede a una digestión enzimática del tejido a 37°C durante 1 hora.

- Tras la digestión el tejido se somete a una agitación mecánica intensa durante 2 minutos. Se dejan decantar los trozos grandes de tejido y se centrifuga el sobrenadante a 1100 r.p.m. durante 5 minutos.
- El precipitado se resuspende, formando un gradiente, en 5 ml. de EBSS y un **inhibidor de la papaína<sup>b</sup>**. Se centrifuga a 1100 r.p.m. durante 5 minutos.
- El precipitado se resuspende en 5 ml del **medio de cultivo**. Se calcula el número de células empleando un hemocitómetro y se siembra la cantidad de células correspondiente a cada tipo de placa. Hasta el momento de ser utilizadas las placas se mantienen en un incubador a 37°C con una atmósfera saturada compuesta por un 95% de O<sub>2</sub> y un 5% de CO<sub>2</sub>. Cada 7 días el medio se sustituye por medio fresco.

#### MEDIO DE CULTIVO

	Concentración
<b>Neurobasal<sup>a</sup></b>	-
<b>B27<sup>a</sup></b>	-
<b>Glutamina<sup>c</sup></b>	0.5 mM
<b>Fungizona<sup>a</sup></b>	0.25-2.5 mg/ml
<b>KCl<sup>d</sup></b>	50 mM

<sup>a</sup> GIBCO BRL; <sup>b</sup> Worthington; <sup>c</sup> Sigma; <sup>d</sup> Merck.

## 2. INMUNOCITOQUÍMICA

Todo el proceso se realizó sobre células sembradas en cubreobjetos de cristal de diámetro variable (20-22 mm).

### Protocolo de inmunocitoquímica en cultivo

- Se fija el cultivo durante 15 minutos a temperatura ambiente empleando **Paraformaldehído<sup>a</sup>** al 4% en **PBS** (*Phosphate Buffer Saline*) 0.1 M.
- Se hacen 3 lavados de 5 minutos con PBS 0.1 M y un lavado de 10-15 minutos con PBS 0.1 M –**Tritón X-100<sup>b</sup>** 0.1 %.
- Se incuba durante toda la noche a 4°C con el **anticuerpo primario** a la dilución correspondiente (habitualmente 1:1000) disuelto en PBS 0.1 M – Tritón X-100 0.1%.
- Se hacen 3 lavados de 5 minutos con PBS 0.1 M.
- Se añade el **anticuerpo secundario** a la dilución correspondiente disuelto en PBS 0.1 M y se incuba 2 horas a temperatura ambiente.
- Se hacen 3 lavados de 5 minutos con PBS 0.1 M.
- Se pasan rápidamente los cubreobjetos por agua destilada y se montan sobre cubreobjetos empleando una mezcla de glicerol-PBS (9:1).

### ANTICUERPO PRIMARIO

	Tipo	Uso
<b>N-GluR2<sup>c</sup></b>	Policlonal de cabra	1:1000

El anticuerpo utilizado reconoce un epítipo extracelular (la porción N-terminal) de la subunidad 2 del receptor de AMPA.



**ANTICUERPO SECUNDARIO**

	<b>Tipo</b>	<b>Uso</b>
<b>Anti-cabra<sup>d</sup></b>	Unido a alexa roja	1:2000-3000

<sup>a</sup> Merk; <sup>b</sup> Sigma; <sup>c</sup> Santa Cruz; <sup>d</sup> Molecular Probes

**ANÁLISIS DE IMÁGEN**

Tras la reacción inmunocitoquímica las imágenes de fluorescencia se captaron empleando un microscopio confocal de la casa Leica. Todas la imágenes correspondientes a un mismo experimento fueron tomadas en las mismas condiciones de voltaje y compensación (*offset*). Posteriormente se realizó la cuantificación de la fluorescencia mediante el programa de análisis de imagen Qwin. La cuantificación se hizo por el método ciego, normalizando en función del tamaño de cada célula (calculado a partir de un umbral mínimo de fluorescencia determinado por la marca inespecífica). Para cada condición se estudiaron un mínimo de 20 células por experimento.

### 3. INMUNOPRECIPITACIÓN

Mediante la técnica de inmunoprecipitación es posible seleccionar, empleando anticuerpos específicos, una proteína determinada a partir de una mezcla compleja de proteínas (ej. un lisado celular). En nuestro caso aplicamos esta técnica sobre lisados procedentes de cultivos de células granulares de 13 días post-siembra realizados a partir de cerebelos de rata de 7 a 9 días de edad postnatal sembrados sobre placas de cultivo de 60 y 100 mm.

#### Protocolo de inmunoprecipitación

- Los cultivos se ayunan en medio mínimo (Neurobasal con KCl 50 mM) durante 3-4 horas y posteriormente se hace el tratamiento correspondiente (estimulación con IGF-I  $10^{-7}$  M o glutamato 100  $\mu$ M).
- Tras la estimulación se despegan y homogenizan las células con **tampón de lisis** y un rascador.
- Se incuba el sobrenadante durante toda la noche a 4° C con el **anticuerpo** contra la proteína de interés a la concentración correspondiente (entre 1:200 y 1:1000, según el anticuerpo).
- Se añaden 30  $\mu$ l/ml de **proteína A-sefarosa<sup>a</sup>** y se mantiene a 4°C durante 2 horas con agitación intensa.
- Se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 1 minuto, se aspira el sobrenadante y se hacen 3 lavados sucesivos del precipitado con tampón de lisis.
- Tras el último lavado se aspira el sobrenadante y se mezcla el precipitado con 65  $\mu$ l de **tampón de carga**. Se hierven las muestras durante 5 minutos y se congelan o se corren en gel de **electroforesis** en condiciones desnaturalizantes para realizar un Western Blot (ver apartado siguiente).

**TAMPÓN DE LISIS**

	Concentración
<b>Tris-HCl, pH 7.4<sup>b</sup></b>	20 mM
<b>NaCl<sup>c</sup></b>	150 mM
<b>Glicerol<sup>c</sup></b>	10 %
<b>CaCl<sub>2</sub><sup>d</sup></b>	1 mM
<b>MgCl<sub>2</sub><sup>c</sup></b>	1 mM
<b>NP-40<sup>d</sup></b>	1 %
<b>Aprotinina<sup>d</sup></b>	1 µg/ml
<b>Leupeptina<sup>d</sup></b>	1 µg/ml
<b>PMSF<sup>d</sup></b>	100 µM
<b>Vanadato Sódico<sup>d</sup></b>	400 µM

**ANTICUERPOS**

Los anticuerpos utilizados fueron los mismos que empleamos en la técnica de Western Blot (ver apartado 4 de *materiales y métodos*). Todos ellos fueron utilizados a una concentración de 1:250.

<sup>a</sup> Amersham-Pharmacia-Biotech; <sup>b</sup> Roche; <sup>c</sup> Panreac; <sup>d</sup> Sigma.

#### 4. ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT

Mediante la técnica de electroforesis de proteínas se logra la separación, mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de un polímero (gel de acrilamida/bisacrilamida), de las proteínas contenidas en una mezcla compleja en función de su tamaño. Tras su separación las proteínas son transferidas a un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa) sobre el que se realiza el marcaje de la proteína de interés empleando anticuerpos específicos (Western Blot).

##### Protocolo para electroforesis de proteínas y Western Blot

- Se empleó un equipo de electroforesis de proteínas de Bio-Rad para minigeles. En cada pocillo se cargaron de 25 a 50  $\mu$ g de proteína total de cada muestra diluida previamente en tampón de carga reductor. Se utilizaron geles de Acrilamida/Bisacrilamida<sup>a</sup> con una concentración comprendida entre el 8 y el 12% según el tamaño de la proteína de interés. Los geles fueron corridos durante toda la noche a 18-20 V.
- Tras la separación, las proteínas fueron electrotransferidas durante 2 horas a 250 mA a una membrana de nitrocelulosa<sup>b</sup> empleando un equipo de transferencia de geles de BioRad. La transferencia se realiza en **tampón Towbin** y a temperatura controlada.
- Tras la transferencia la membrana se lava brevemente con agua destilada y se realiza un bloqueo de los sitios de unión inespecíficos mediante una incubación con leche desnatada al 8% en **TTBS** (*Tween-Tris Buffer Saline*).
- Se incuba la membrana durante toda la noche a 4°C con el **anticuerpo primario** a la concentración correspondiente (normalmente 1:1000) en TTBS con BSA (*Bovine Serum Albumine*)<sup>c</sup> al 2.5% y azida 0.01M.
- La membrana se lava 3 veces con TTBS.
- Se incuba la membrana durante 2 horas a temperatura ambiente con el **anticuerpo secundario** correspondiente (en función del tipo de anticuerpo primario)

- La membrana se lava 3 veces con TBS (*Tris Buffer Saline*).
- Se incuba la membrana con una solución quimioluminiscente<sup>d</sup> para realizar la inmunodetección. La membrana se expone un tiempo variable con una película de autorradiografía (Hyperfilm)<sup>d</sup> y se revela inmediatamente.

#### ANTICUERPOS PRIMARIOS

	Tipo	Uso
<b>GluR 1<sup>e</sup></b>	Policlonal de conejo	1:1000
<b>GluR 2/3<sup>f</sup></b>	Policlonal de conejo	1:1000
<b>GluR 6<sup>g</sup></b>	Policlonal de cabra	1:1000
<b>GSK-3<math>\beta</math><sup>h</sup></b>	Monoclonal de ratón	1:1000
<b>Fyn<sup>i</sup></b>	Policlonal de conejo	1:1000
<b>Lyn<sup>g</sup></b>	Policlonal de conejo	1:1000
<b>PY20 (P-Tyr)<sup>h</sup></b>	Monoclonal de ratón	1:1000
<b>KM (P-Tyr)<sup>i</sup></b>	Policlonal de conejo	1:1000
<b>FAK<sup>g</sup></b>	Policlonal de cabra	1:1000
<b>P-MAP-K<sup>k</sup></b>	Policlonal de conejo	1:1000
<b>P-Akt<sup>k</sup></b>	Policlonal de conejo	1:1000

**ANTICUERPOS SECUNDARIOS**

	<b>Tipo</b>	<b>Uso</b>
<b>Anti-conejo<sup>j</sup></b>	Unido a peroxidasa	1:20000
<b>Anti-ratón<sup>i</sup></b>	Unido a peroxidasa	1:20000
<b>Anti-cabra<sup>g</sup></b>	Unido a peroxidasa	1:20000
<b>Proteína A/G<sup>g</sup></b>	Unido a peroxidasa	1:20000

<sup>a</sup> BioRad; <sup>b</sup> SS; <sup>c</sup> Sigma; <sup>d</sup> Amersham-Pharmacia-Biotech; <sup>e</sup> Chemicon; <sup>f</sup> Anticuerpo generado por Eva García Galloway (Instituto Cajal); <sup>g</sup> Santa Cruz; <sup>h</sup> Transduction Laboratories; <sup>i</sup>Anticuerpo generado por Sebastián Pons Fuxá (Instituto Cajal); <sup>j</sup> Jackson; <sup>k</sup> New England Biolabs.

**DENSITOMETRÍA**

Tras el revelado, la película de autorradiografía fue escaneada a una resolución gráfica de 150 ppp empleando un scanner marca Primax. La cuantificación de las bandas se realizó empleando el programa 1D-Manager de la empresa TDI.

## 5. EXTRACCIÓN DE MEMBRANAS CELULARES

Para realizar la separación de los lisados totales procedentes de cultivos de 13 días post-siembra en distintas fracciones celulares nos basamos en el protocolo de Arai y Cohen (*Arai, M. et al., 1994*).

### Protocolo para la preparación de extractos de membranas

- Se lisan las células por choque osmótico empleando un **tampón de extracción de membranas**. Se rascan las células del fondo de la placa de cultivo y se homogenizan empleando una punta de pipeta.
- El lisado se centrifuga a 1000 g durante 10 minutos con objeto de precipitar la fracción nuclear y el citoesqueleto.
- El sobrenadante se centrifuga a 25000 g durante 10 minutos. En el precipitado estarán las membranas plasmáticas. Ahora se resuspende en solución fisiológica, tampón de carga o tampón de lisis según el tipo de ensayo biológico a realizar.

### TAMPÓN DE EXTRACCIÓN DE MEMBRANAS:

	Concentración
<b>NaHCO<sub>3</sub><sup>a</sup></b>	5 mM
<b>Aprotinina<sup>b</sup></b>	1 µg/ml
<b>Leupeptina<sup>b</sup></b>	1 µg/ml
<b>PMSF<sup>b</sup></b>	100 µM

<sup>a</sup> Merck; <sup>b</sup> Sigma

### **6. ELECTROFISIOLOGÍA**

Para realizar los registros electrofisiológicos empleamos la técnica de parche (*patch-clamp*) en la modalidad de célula completa.

#### **6.1. EQUIPOS Y SOLUCIONES EMPLEADAS**

##### **6.1.1. Cámara de registro**

La cámara de registro consistió en una placa de Petri de material plástico cortada con un volumen final de 2 ml. En la cámara se colocaban, sobre una gota de vaselina médica, los cubreobjetos de 20 mm que contenían las células a estudiar. Las células fueron visualizadas mediante un microscopio Nikon colocado dentro de una torre con tres sistemas de micromanipuladores que permitían el movimiento por separado de la pipeta de registro, la placa de registro y el sistema de perfusión. A su vez todo el sistema estaba acoplado sobre una mesa con dispositivo neumático de amortiguación que impedía la transmisión de las vibraciones ambientales a la preparación.

Todos los experimentos fueron realizados a Tª ambiente (20-23 °C).

##### **6.1.2. Microelectrodos**

Se emplearon electrodos de plata clorada (Ag/AgCl) incluidos en micropipetas de vidrio afilado rellenas con la solución intracelular. Las micropipetas se obtuvieron a partir de microcapilares de vidrio de borosilicato (WPI) de 1.5 mm de diámetro externo y 0.7 mm de diámetro interno con un fino



capilar interno para facilitar el llenado. Para su fabricación se empleó un estirador de pipetas (modelo P80, Sutter Instruments). La resistencia de las micropipetas osciló entre 4-8 MOhm. Como electrodo de referencia se empleó un electrodo indiferente de plata clorada (Ag/AgCl) de baja resistencia en comunicación con la solución de perfusión a través de un puente salino de agar (agar al 3% con KCl a una concentración menor o igual que la concentración de cloruros de la solución intracelular).

### **6.1.3. Sistema de perfusión y estimulación**

La entrada del líquido en la cámara de registro se hizo por gravedad mientras que la salida se hizo por aspiración. Se empleó una doble línea de entrada, una con solución extracelular normal y otra con solución extracelular modificada (con IGF-I, inhibidores, etc.).

Para la estimulación de las células se empleó un sistema de micropulsos de aire comprimido (Picospritzer II, General Valve). Este sistema estaba conectado a un capilar de vidrio afilado (una pipeta de las empleadas para el registro electrofisiológico) llena de la solución con la que queríamos estimular a la célula. Esta pipeta estaba conectada al sistema impulsor del aire y unida, mediante un vástago de metal, a un sistema de micromanipulación que permitía moverla y colocarla de una forma muy precisa en la posición deseada.

### **6.1.4. Soluciones de registro**

Las soluciones extra e intracelular empleadas fueron tomadas, con ligeras modificaciones, de los trabajos del grupo de Connor (*Yuzaki, M. et al., 1996*).

**SOLUCIÓN EXTRACELULAR**

	Concentración
<b>NaCl<sup>a</sup></b>	150 mM
<b>KCl<sup>a</sup></b>	5 mM
<b>CaCl<sub>2</sub><sup>b</sup></b>	2 mM
<b>Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>b</sup></b>	2 mM
<b>Hepes<sup>c</sup></b>	10 mM
<b>Glucosa<sup>a</sup></b>	20 mM

El pH se ajustó a 7.3-7.4 empleando NaOH. La osmolaridad se ajustó en torno a los 310-315 mOs.

**SOLUCIÓN INTRACELULAR**

	Concentración
<b>Gluconato Potásico<sup>b</sup></b>	130 mM
<b>KCl<sup>a</sup></b>	10 mM
<b>CaCl<sub>2</sub><sup>a</sup></b>	1 mM
<b>MgCl<sub>2</sub><sup>b</sup></b>	2 mM
<b>EGTA<sup>b</sup></b>	11 mM
<b>Hepes<sup>c</sup></b>	10 mM
<b>Na<sub>2</sub>-ATP<sup>b</sup></b>	2 mM

En este caso el pH se ajustó a 7.3 empleando KOH. La osmolaridad se ajustó en 290-300 mOs.

<sup>a</sup> Panreac; <sup>b</sup> Sigma; <sup>c</sup> Merck

#### 6.1.5. Drogas y toxinas

##### AGONISTAS Y MODULADORES

	Concentración
Glutamato <sup>a</sup>	1M
AMPA <sup>b</sup>	10 mM
Kainato <sup>c</sup>	1 mM
NMDA <sup>a</sup>	50 mM
IGF-I <sup>d</sup>	10 <sup>-8</sup> M

##### BLOQUEANTES

	Concentración
Wortmanina <sup>c</sup>	100 mM
JB-1 <sup>e</sup>	10 <sup>-6</sup> M
PD98059 <sup>f</sup>	20 µM

<sup>a</sup> Sigma; <sup>b</sup> Genosys; <sup>c</sup> Tocris; <sup>d</sup> Gro. Pep.; <sup>e</sup> Chiron; <sup>f</sup> New England Biolabs.

## 6.2 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

Los registros electrofisiológicos se realizaron empleando la técnica de parche (*patch-clamp*) en su configuración de célula completa. Se emplearon dos modalidades:

- modalidad de **fijación de voltaje** o “voltage-clamp”, para detectar las distintas corrientes que atraviesan la membrana de la célula registrada.
- modalidad de **fijación de corriente** o “current-clamp”, para detectar los cambios del potencial transmembrana en la célula.

Para realizar los registros se empleó un amplificador EPC-7 (List Electronics). Los estímulos de voltaje o de corriente y las correspondientes respuestas de corriente o voltaje de la célula (según estuviéramos en fijación de corriente o fijación de voltaje), fueron visualizadas en un osciloscopio digital (Tektronic 2221). Las señales de estimulación y las respuestas de las células se generaron y se registraron, respectivamente, empleando el programa de ordenador “Clampex”, incluido dentro del conjunto de programas pClamp (versión 5.5.1; Axon Instruments), mediante un ordenador PC386SX, a través de una tarjeta de conversión analógico-digital. Las frecuencias utilizadas para la digitalización de los registros nunca fueron inferiores a 2 kHz ni superiores a los 0.3 MHz. Los registros fueron filtrados (con frecuencias de corte nunca inferiores a 1 KHz) mediante el uso de un filtro externo (Kemo, tipo VBF/4).

Los experimentos se realizaron de acuerdo con lo descrito previamente por Hamill et al. 1981 (*Hamill, O. P. et al., 1981*). Inicialmente partimos de la configuración de fijación de voltaje. Al introducir la pipeta en el baño, y antes de tocar la membrana, se compensó la diferencia de potencial entre el electrodo de la pipeta y el indiferente o electrodo de referencia. La pipeta de registro se presionó mediante un macromanipulador contra la célula y se aplicó succión a través de un tubo conectado a ella. De este modo se establece un contacto de alta resistencia (del orden de GigaOhmios= $10^{12}$  Ohmios) entre la pipeta y la

membrana llamado “*gigaseal*” o sello de alta resistencia. En ese momento se cambió el potencial de la pipeta a valores negativos (semejantes a potencial de membrana, en torno a los  $-70$  mV respecto al potencial del baño), y se inyectaron una serie de pulsos repetitivos de 10 mV de amplitud, para el seguimiento de los cambios de corriente que se producían a través de la pipeta de registro. En ese momento se empleó el sistema rápido de compensación de la capacidad (C-FAST) para compensar las corrientes transitorias provocadas por la capacidad del soporte de la pipeta (holder) y las paredes de la pipeta. A continuación se continuó succionando lentamente hasta que se produjo un incremento brusco en el tamaño de los transitorios capacitivos. Esta corriente adicional se consideró como la contribución de toda la capacidad de la membrana celular a la capacidad de la pipeta previamente compensada una vez se hubo roto el fragmento de membrana que separaba el interior de la célula del interior de la pipeta. A continuación se dejó la célula en reposo unos minutos para estabilizar el contacto membrana-pipeta y permitir que se produjera la dialización del contenido intracelular. Una vez el acceso al interior de la célula se estabilizó se empleó el sistema de compensación lento (C-SLOW) para la compensación de los transitorios lentos, que son un reflejo del valor de la capacidad celular. Antes de la realización de los registros electrofisiológicos se compensó en un 60 a un 80% la resistencia en serie ( $R_s$ ) con objeto de evitar errores en la medida del potencial de membrana y en el registro de las corrientes rápidas que se generen.

---

## RESULTADOS

---

### 1. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO DE CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO

Todos los experimentos se realizaron empleando cultivos de **células granulares** de **cerebelo**. Estas células son las más numerosas de todo el sistema nervioso y se localizan en la capa granular del cerebelo. Sus axones no mielinizados ascienden hasta alcanzar la capa molecular donde se bifurcan en T, formando las llamadas **fibras paralelas**. Estas fibras se extienden, perpendiculares a las dendritas de las células de Purkinje, por una distancia de varios milímetros y establecen sinapsis con las dendritas distales de varios miles de éstas neuronas. Cada Purkinje recibe información de, aproximadamente, 200.000 fibras paralelas. El potencial de acción evocado por estas fibras en las células de Purkinje es gradual y se conoce con el nombre de **espiga simple** (Ito, M., 1984).

#### 1.1. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Todo el estudio lo hemos realizado utilizando cultivos de entre 3 y 13 días post-siembra obtenidos a partir de cerebelos de ratas Wistar de 7 a 9 días de edad postnatal. A estas edades las células granulares de cerebelo constituyen un modelo ideal ya que:

- 1) expresan tanto el receptor de IGF-I como todo su sistema de **traducción de señal**: al estimular el cultivo con IGF-I se produce la activación por fosforilación de dos proteínas (MAP-quinasa y Akt) asociadas a las dos rutas principales de señalización del IGF-I: la ruta de la PI3-quinasa (PI3-K) y la ruta de la MAP-quinasa (MAP-K) (ver figura 1, apartado A).

- 2) poseen todos los tipos de **receptores de glutamato**. Sin embargo, como pudimos comprobar al realizar una caracterización bioquímica de los niveles de expresión de las subunidades de estos receptores a diferentes tiempos, no todas las subunidades se expresan desde el primer día de cultivo. Al comienzo de nuestro estudio no existían anticuerpos comerciales contra todos los tipos de subunidades por lo que nos centramos en estudiar la expresión de las subunidades GluR1 y GluR2/3 de los receptores de AMPA y la subunidad GluR6 de los receptores de Kainato.

Al realizar el curso temporal de expresión de la subunidad 1 del receptor de **AMPA (GluR1)** observamos que no existe un nivel apreciable de expresión hasta el día 13 de cultivo (ver figura 1, apartado B).

Respecto a la subunidad **GluR2/3** del receptor de **AMPA** (el anticuerpo que utilizamos reconoce un epítipo común para ambas subunidades y no permite discriminar entre GluR2 y GluR3), es posible detectar la expresión de dicha subunidad desde el día 1 de cultivo y su nivel de expresión aumenta progresivamente hasta día 13 (ver figura 1, apartado C).

En el caso de la subunidad **GluR6** del receptor de **Kainato**, su expresión comienza aproximadamente en el día 6 de cultivo y se incrementa considerablemente hasta el día 13 (ver figura 1, apartado D).

## 1.2. CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA

Desde un punto de vista electrofisiológico las células granulares resultan muy adecuadas ya que, debido a su pequeño tamaño y a su forma redondeada con pocas prolongaciones, es relativamente sencillo fijar su potencial de membrana evitando así los errores experimentales derivados de un mal control del potencial.

En nuestros cultivos realizamos registros electrofisiológicos de la actividad de los distintos receptores ionotrópicos de glutamato (AMPA, Kainato y NMDA) a diferentes tiempos. Todos los registros fueron realizados mediante la técnica de parche (patch-clamp) en célula completa en la modalidad de fijación de voltaje (ver *materiales y métodos*). En los primeros dos días de cultivo se observó una gran inestabilidad en las respuestas por lo que todos los registros fueron realizados a partir del día 3.

En el caso de los receptores de **AMPA**, en los primeros días no se observan respuestas apreciables a la estimulación por AMPA 10 mM y hubo que esperar hasta el día 11 y posteriores para obtener respuestas apreciables y estables (ver figura 2, apartado A). Esta falta de respuesta a la estimulación por AMPA en los primeros días en cultivo ha sido observada también en cultivos de células piramidales de hipocampo (*Lerma, J., 1997*). Por este motivo todos los registros electrofisiológicos de la actividad de los receptores de AMPA los realizamos empleando cultivos de más de 11 días post-siembra.

En el caso de los receptores de **Kainato** comprobamos que desde el primer día de cultivo es posible obtener respuestas estables a la estimulación por Kainato 1 mM (ver figura 2, apartado B). En general las respuestas de Kainato se caracterizan por su gran estabilidad independientemente de la edad del cultivo. Realizamos todos los experimentos a partir del día 3 y hasta el día 8 como máximo, ya que a este tiempo de cultivo, las células granulares no responden a la estimulación por AMPA (ver figura 2, apartado A) y, de este modo, evitamos los problemas de activación cruzada que presentan ambos agonistas, asegurando que obtenemos respuestas puras de Kainato.

Desde el día 3 los cultivos de células granulares presentaron respuestas medibles a la estimulación con **NMDA** 50 mM (ver figura 2, apartado C) por lo que los estudios con estos receptores se realizaron desde el día 4 y hasta el día 8.



Al estimular los cultivos con **glutamato** 1 M pudimos registrar respuestas medibles y estables desde el día 3 de cultivo (ver figura 2, apartado D) por lo que los experimentos fueron realizados desde el día 3 hasta el día 13 post-siembra.

## 2. EFECTOS MODULADORES DEL IGF-I SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO

A lo largo del tiempo se han ido acumulando evidencias que apoyan la hipótesis de que el IGF-I podría estar mediando mecanismos de plasticidad sináptica en el SNC. Datos indirectos obtenidos por nuestro laboratorio sugieren que el IGF-I podría actuar como modulador de la actividad de los receptores de glutamato en el cerebelo de la rata adulta y que podría estar participando en procesos plásticos en esa estructura (*Castro-Alamancos, M. A. et al., 1996; Castro-Alamancos, M. A. et al., 1994; Castro-Alamancos, M. A. et al., 1993*).

Con objeto de caracterizar el posible efecto modulador del IGF-I sobre la actividad de los receptores ionotrópicos de glutamato, realizamos registros electrofisiológicos en células granulares de cerebelo de edades comprendidas entre 3 y 13 días de cultivo, eligiendo la edad más adecuada para cada tipo de receptor. En todos los experimentos se emplearon células con una **morfología** similar (bipolar) y, aproximadamente, el mismo **tamaño** estimado en base a dos parámetros:

- Medida directa del tamaño del cuerpo celular mediante la utilización de una **escala graduada** situada en el ocular del microscopio. Las células elegidas tenían tamaños comprendidos entre 15 y 25  $\mu\text{m}$ .
- Cálculo de la **capacidad** de la membrana mediante la compensación de la C-slow. La C-slow sirve como valor estimativo del tamaño celular (ver *materiales y métodos*). Las células elegidas tenían capacidades comprendidas entre 55 y 75 pF.

## 2.1. DEPRESIÓN DE LAS RESPUESTAS DEL RECEPTOR DE AMPA INDUCIDA POR IGF-I

Para estudiar el efecto modulador del IGF-I sobre la actividad del receptor de AMPA diseñamos una serie de experimentos en los que realizamos registros electrofisiológicos de células granulares estimuladas con una breve infusión (20-50 ms) de una solución de AMPA 10 mM. Desechamos todas aquellas células que no presentaron respuestas estables a la estimulación por AMPA (en todos los casos se esperó un tiempo variable hasta obtener una respuesta estable) o cuya amplitud de respuesta fue inferior a 40 pA.

El IGF-I produjo una **reducción** de un 30 a un 40 % de las respuestas inducidas por AMPA en las células granulares (ver figura 3, apartado A). Este efecto fue muy homogéneo y se produjo sobre el **100 %** de las células estudiadas (ver figura 3, apartado B). Aunque la depresión inducida por el IGF-I es **reversible** se mantiene durante todo el tiempo que el IGF-I permanece en la solución extracelular. Tras sustituir el medio por una solución sin IGF-I el efecto se lava de forma progresiva en un tiempo mínimo de 14 minutos aunque, como se ve en el apartado A de la figura 3, en ninguno de los casos estudiados conseguimos un 100 % de lavado.

## 2.2. POTENCIACIÓN DE LAS RESPUESTAS DEL RECEPTOR DE KAINATO INDUCIDA POR IGF-I

Para estudiar el posible efecto modulador del IGF-I sobre los receptores de Kainato realizamos registros electrofisiológicos en células granulares en cultivo estimuladas con una breve infusión (20-50 ms) de una solución de Kainato 1 mM. De nuevo, desechamos todas aquellas células que no presentaron respuestas estables a la estimulación por Kainato (aunque, en

general, las respuestas inducidas por Kainato son muy estables) y todas aquellas cuya amplitud de respuesta fue inferior a 100 pA.

En este caso el IGF-I tuvo el efecto contrario al del AMPA y produjo una **potenciación** de las respuestas inducidas por el **Kainato** sobre las células granulares (ver figura 4, apartado A). En total el IGF-I produjo de un 40 a un 80 % de aumento de las respuestas de Kainato. Sin embargo este efecto no fue tan homogéneo como en el caso del receptor de AMPA ya que ocurrió sobre el 78 % de las células estudiadas, mientras que en un 11 % el IGF-I produjo una depresión de la respuesta y no tuvo efecto en el 11 % restante (ver figura 4, apartado B). También en este caso el efecto del IGF-I se mantiene durante todo el tiempo que está presente en la solución extracelular. De nuevo es un efecto reversible que es posible lavar en un tiempo mínimo de 17 minutos.

### **2.3. EL IGF-I NO TIENE EFECTO SOBRE LAS RESPUESTAS DE LOS RECEPTORES DE NMDA**

Realizamos registros de las respuestas de las células granulares de 8 días post-siembra a la estimulación con NMDA desechando todas aquellas células que no presentaron respuestas estables y todas aquellas cuya amplitud de respuesta fue inferior a 50 pA.

En este caso el IGF-I **no tuvo ningún efecto** sobre la respuesta de las células granulares a la estimulación con **NMDA** 50 mM. La amplitud de la respuesta control fue exactamente igual a la amplitud de la respuesta tras estimulación con IGF-I, independientemente del tiempo que el IGF-I permaneció en el baño (20 minutos máximo) (ver figura 5, apartado A). Esta falta de efecto la pudimos observar en el 86 % de las células estudiadas (ver figura 5, apartado B) mientras que, tan sólo en un 11 % de ellas, el IGF-I produjo una depresión de la respuesta inducida por el NMDA.

## 2.4. EL IGF-I TIENE DISTINTOS EFECTOS SOBRE LAS RESPUESTAS INDUCIDAS POR EL GLUTAMATO

En los experimentos previos hemos utilizado agonistas específicos para estudiar el efecto modulador del IGF-I sobre la actividad de cada uno de los tipos de receptores ionotrópicos de glutamato presentes en las células granulares. El glutamato, sin embargo, produce una activación de todos los tipos de receptores de glutamato presentes en la célula. En este caso las células fueron estimuladas mediante una breve infusión (20-50 ms) con una solución de **glutamato 1 M**. Como siempre desechamos todas células que no presentaron respuestas estables así como todas aquellas cuya amplitud de respuesta fue inferior a 35 pA.

El IGF-I tuvo efectos moduladores distintos sobre las respuestas de las células granulares a la estimulación con glutamato. En una serie de células (**44%**) el IGF-I produjo una **potenciación** de la respuesta inducida por el **glutamato**, produciendo de un 40 a un 50 % de aumento de la respuesta original, mientras que en otra serie de células (**44%**) el IGF-I indujo una **depresión** de dicha respuesta produciendo de un 20 a un 35 % de reducción (ver figura 6, apartados A y B). En otro pequeño porcentaje de células (12%) el IGF-I no tuvo ningún efecto. Al igual que en los casos anteriores, el efecto es **reversible** y se lava de forma progresiva tras sustituir el medio por una solución sin IGF-I. Tampoco en ninguno de los casos estudiados conseguimos un 100 % de lavado del efecto modulador del IGF-I. No existe ninguna relación aparente entre el tipo de efecto y la edad del cultivo, tamaño o morfología celular.

Todo lo anterior indica que el IGF-I tiene un efecto modulador rápido y reversible sobre las respuestas de los receptores ionotrópicos de glutamato. Este efecto es distinto, e incluso opuesto, según el tipo de receptor de glutamato lo que sugiere que el IGF-I podría tener distintos efectos sobre tipos celulares similares dependiendo de su composición de receptores.

### **3. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN EL EFECTO MODULADOR DEL IGF-I SOBRE LOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO**

#### **3.1. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA MODULACIÓN POR IGF-I DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE KAINATO**

A diferencia de los receptores de AMPA, la fisiología y función de los receptores de Kainato dentro del SNC es mucho menos conocida. Se ha visto que estos receptores se localizan tanto en sitios sinápticos (*Castillo, P. E. et al., 1997*) como extrasinápticos (*Rodriguez-Moreno, A. et al., 1997*) y que en determinadas áreas cerebrales podrían estar mediando la transmisión sináptica rápida aunque, a este respecto, los datos son contradictorios (*Lerma, J. et al., 1997*). Se ha sugerido también que el Kainato podría estar implicado en algunas enfermedades como la epilepsia (*Contractor, A. et al., 2000; Rodriguez-Moreno, A. et al., 1997*) y, recientemente, se ha descrito un posible efecto metabotrópico de este tipo de receptores, relacionándolos con la modulación de la liberación de ciertos neurotransmisores en el SNC (*Rodriguez-Moreno, A. et al., 1998*).

Hasta el momento no se ha descrito ninguna modulación del receptor de Kainato dependiente de factores de crecimiento por lo que la potenciación inducida por el IGF-I constituye la primera evidencia de un efecto modulador mediado por un factor trófico sobre este tipo de receptores.

Con objeto de determinar la vía implicada en el efecto modulador del IGF-I utilizamos drogas específicas para bloquear la ruta de señalización del IGF-I en diferentes puntos. Inicialmente realizamos un bloqueo del receptor de IGF-I utilizando JB-1 ( $10^{-6}$ M), un péptido inactivo análogo al IGF-I que produce una inhibición competitiva de su receptor. Utilizando este inhibidor pudimos bloquear completamente la acción del IGF-I en, aproximadamente, el 70% de los casos

estudiados (n=9), mientras que en el 30% restante no se produjo bloqueo del efecto del IGF-I (ver figura 7, apartado A).

Para estudiar la posible participación de la ruta de la PI3-quinasa realizamos un bloqueo de esta quinasa utilizando Wortmanina (100 nM). Este inhibidor a la concentración utilizada produjo un bloqueo total en el 100% de los casos estudiados (n=7) del efecto potenciador del IGF-I sobre la actividad de los receptores de Kainato (ver el apartado A de la figura 7).

Con objeto de ver la implicación de la ruta de la MAP-quinasa bloqueamos a esta enzima empleando un inhibidor específico, el PD98059 (20  $\mu$ M). Como se puede ver en el apartado A de la figura 7, este bloqueante no fue capaz de inhibir el efecto del IGF-I en el 90% de los casos (n=10), mientras que tan sólo en una de las células estudiadas produjo un bloqueo total del efecto modulador del IGF-I.

De estos experimentos de bloqueo de la vía de señalización del IGF-I se deduce que el efecto potenciador de este factor trófico sobre la actividad del receptor de Kainato es dependiente de la activación de la ruta de la PI3-quinasa e independiente de la activación de la ruta de la MAP-quinasa.

### **3.2. MECANISMO MOLECULAR IMPLICADO EN LA DEPRESIÓN DEPENDIENTE DE IGF-I DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE AMPA**

Para determinar los mecanismos moleculares que median el efecto modulador del IGF-I sobre las respuestas de los receptores ionotrópicos de glutamato decidimos centrarnos en los receptores de **AMPA** debido a su enorme importancia biológica. Estos receptores median la mayor parte de la neurotransmisión excitatoria rápida del SNC de mamíferos y se piensa que su

modulación dependiente de actividad está en la base de los procesos de plasticidad sináptica que se producen en el cerebro adulto. Evidencias previas de nuestro laboratorio sugieren que estos receptores podrían estar siendo modulados “*in vivo*” por el IGF-I (Castro-Alamancos, M. A. *et al.*, 1996; Castro-Alamancos, M. A. *et al.*, 1994; Castro-Alamancos, M. A. *et al.*, 1993), aunque se desconocen los mecanismos moleculares a través de los cuales este factor trófico podría estar produciendo dicho efecto.

Como hemos visto, el IGF-I modula de forma diferencial las respuestas de los receptores de glutamato en células granulares de cerebelo. La eficacia de una conexión sináptica se puede variar a través de diferentes mecanismos entre los que se incluyen la modificación de la disponibilidad de receptores y/o la regulación de su estado funcional. La disponibilidad de receptores en la célula postsináptica puede estar regulada por procesos de endocitosis/exocitosis de receptores funcionales y/o por cambios morfológicos a nivel de los contactos sinápticos. El estado funcional de un receptor se puede modificar mediante varios mecanismos entre los que destacan la modificación de su estado de fosforilación y la modulación de interacciones con otras proteínas e iones.

### **3.2.1. Modulación por IGF-I de la disponibilidad de receptores de AMPA en la membrana plasmática de la célula postsináptica**

Aunque tradicionalmente se pensaba que los mecanismos que regulan la disponibilidad de receptores en la célula postsináptica eran muy lentos actualmente hay un número creciente de evidencias que indican que estos procesos se regulan muy rápidamente, pudiendo mediar fenómenos plásticos a corto plazo (Turrigiano, G. G., 2000; Luscher, C. *et al.*, 1999).

Basándonos en estos datos diseñamos una serie de experimentos con objeto de estudiar si la depresión inducida por el IGF-I sobre la respuesta de los receptores de AMPA podía deberse a una modulación de la disponibilidad de



dichos receptores en la célula postsináptica. Todos los experimentos se realizaron con cultivos de células granulares de cerebelo de 13 días post-siembra con objeto de que existiera un nivel suficiente de expresión de las distintas subunidades de los receptores de glutamato. Previamente a la estimulación, las células se ayunaron de 3 a 4 horas con un medio sin factores tróficos (Neurobasal con KCl 25 mM). El cultivo se estimuló añadiendo el **IGF-I** directamente en el medio de ayuno a una concentración de  $10^{-7}$  M y manteniéndolo durante 5 minutos, o añadiendo **glutamato** a una concentración de 100  $\mu$ M durante 3 minutos.

Para detectar la posible internalización de los receptores de AMPA inicialmente marcamos todas las subunidades de tipo 2 del receptor de AMPA (**GluR2**) localizadas en la membrana plasmática empleando un anticuerpo que reconoce un epítipo extracelular de la región N-terminal (extracelular) de esta subunidad. Una vez marcadas estimulamos a las células durante 5 minutos con IGF-I o durante 3 minutos con glutamato. Tras la estimulación se produjo una reducción de la marca fluorescente en la membrana plasmática (ver figura 8, apartado A) lo que sugiere que se ha producido una internalización de la subunidad 2 o una pérdida de inmunoreactividad. La posterior cuantificación mediante análisis de imagen confirmó este descenso de fluorescencia en la membrana plasmática. El glutamato tuvo el mismo efecto que el IGF-I y, en este caso, lo utilizamos como control positivo ya que recientemente se ha descrito que induce una internalización del receptor de AMPA a través de un mecanismo de endocitosis mediada por vesículas de clatrina (*Turrigiano, G. G., 2000; Carroll, R. C. et al., 1999*).

Posteriormente estudiamos la cantidad de receptor presente en los distintos compartimentos mediante la técnica de Western Blot empleando un anticuerpo específico contra la subunidad 2/3. Tras el tratamiento con IGF-I y/o con glutamato realizamos una separación diferencial de los lisados celulares procedentes del cultivo en fracción de membrana y fracción citoplásmica observando que, tanto el IGF-I como el glutamato, producen un rápido descenso (en un tiempo inferior a 5 minutos) de los niveles de proteína de la subunidad 2/3

detectada en la fracción de membrana (ver figura 8, apartado B). Como se puede observar en el apartado C de la figura 8, este descenso de los niveles de GluR2/3 en la membrana va acompañado, en paralelo, por un ligero incremento de los niveles de esta subunidad en la fracción citoplásmica. Esto se podría interpretar como que el IGF-I está induciendo un desplazamiento de la subunidad 2/3 del receptor de AMPA desde la membrana plasmática al interior celular, produciendo una disminución de los niveles de proteína en la fracción de membrana y un incremento en la fracción citoplásmica.

Mediante esta serie de experimentos podemos concluir que tanto el IGF-I como el glutamato, su ligando endógeno, producen una rápida internalización de la subunidad 2 del receptor de AMPA lo que conduciría a una reducción del número de receptores de AMPA situados en la membrana plasmática o a una variación de su funcionalidad. Este podría ser un posible mecanismo que podría explicar el efecto depresor del IGF-I sobre la actividad del receptor de AMPA.

### **3.2.2. Modificación del estado de fosforilación de una proteína asociada a la subunidad 2/3 del receptor de AMPA**

Uno de los posibles mecanismos de regulación de la actividad de los receptores y canales iónicos en el cerebro es la modificación covalente de su estructura por la incorporación de grupos fosfato en residuos de serina (Ser), tirosina (Tyr) o treonina (Thr). Desde hace tiempo se sabe que la actividad de los receptores de glutamato se modifica por fosforilación de sus subunidades (*Raymond, L. A. et al., 1994; Roche, K. W. et al., 1994*).

Con objeto de estudiar la capacidad del IGF-I para inducir una modificación en el estado de fosforilación de las subunidades del receptor de AMPA o de proteínas asociadas a ellas, diseñamos una serie de experimentos

basados en la utilización de anticuerpos fosfoespecíficos. Inicialmente comenzamos el estudio empleando anticuerpos específicos para residuos fosforilados en tirosina.

Tras la estimulación con IGF-I realizamos una inmunoprecipitación de todas las proteínas con residuos de tirosina fosforilados presentes en el cultivo comprobando que, tras **5 minutos** de estimulación con IGF-I, se produce un considerable aumento del nivel de fosforilación en tirosina de la subunidad 2/3 del receptor AMPA o de una proteína asociada a ella (ver figura 9, apartado A). Tras **15 minutos** de exposición al IGF-I, su estado de fosforilación vuelve al nivel basal (figura 9, apartado A). En este experimento utilizamos a la proteína **FAK** (*Focal Adhesion Kinase*) como control positivo de la acción a medio plazo del IGF-I ya que, como se ha descrito, resulta fosforilada en tirosina por efecto del IGF-I con un curso temporal lento (15 minutos) (*Kim, B. et al., 1998*).

Cuando realizamos la inmunoprecipitación opuesta utilizando un anticuerpo específico contra la subunidad 2/3 podemos ver que esta subunidad no está fosforilada basalmente en residuos de tirosina y que el IGF-I no varía su estado de fosforilación (figura 9, apartado B). Esto indica que el incremento de fosforilación en tirosinas inducido por el IGF-I no se produce sobre la propia subunidad sino sobre una proteína asociada a ella. Aunque inicialmente se sugirió que los receptores de glutamato podían fosforilarse en residuos de tirosina (*Moss, S. J. et al., 1993*) ya que sus subunidades presentan sitios potenciales de fosforilación, actualmente se sabe que las subunidades de los receptores de AMPA se fosforilan exclusivamente en residuos de serina y treonina (*Carvalho, A. L. et al., 1999; Matsuda, S. et al., 1999; Roche, K. W. et al., 1996; Nakazawa, K. et al., 1995*). El receptor de AMPA, sin embargo, forma complejos multimoleculares con gran número de proteínas por lo que es muy posible que la subunidad 2/3 esté asociada a alguna proteína susceptible de ser fosforilada en tirosinas por el IGF-I y que sea esta proteína desconocida la que co-inmunoprecipite junto a GluR2/3 al utilizar un anticuerpo específico contra fosfotirosinas.

El efecto del IGF-I sobre el nivel de fosforilación se produce sobre una proteína asociada específicamente a la subunidad 2/3 pero no a las subunidades GluR1 y GluR6 de los receptores de AMPA y Kainato respectivamente (figura 9, apartado C).

Todos estos datos sugieren que el IGF-I induce un aumento en el nivel de fosforilación en tirosinas de una proteína desconocida asociada específicamente a la subunidad GluR2/3 del receptor de AMPA.

### **3.3. MOLÉCULAS MEDIADORAS DEL EFECTO DEL IGF-I SOBRE LAS RESPUESTAS DEL RECEPTOR DE AMPA**

Los receptores de glutamato se asocian formando complejos multimoleculares con gran cantidad de proteínas con funciones diversas (proteínas estructurales, reguladoras, etc.) (*Husi, H. et al., 2000; Braithwaite, S. P. et al., 2000*). En el caso del receptor de AMPA los cambios estructurales y funcionales de los elementos que forman parte de estos complejos podrían estar modulando su función así como podrían ser responsables del proceso de internalización de dicho receptor. Entre las proteínas que se asocian con los receptores de AMPA se encuentran GRIP1 (*Dong, H. et al., 1997*), ABP (*Srivastava, S. et al., 1998*), algunas proteínas de la familia de las **Src-quinasas** como Lyn (*Hayashi, T. et al., 1999*) y toda una serie de nuevas proteínas cuyo número va en aumento (PICK1, SAP97, NSF, etc.) (*Xia, J. et al., 1999; Song, I. et al., 1998; Leonard, A. S. et al., 1998*).

Inicialmente comenzamos estudiando la asociación entre GRIP1 y el receptor de AMPA comprobando que, como posteriormente fue descrito por otros autores (*Dong, H. et al., 1999*), en células granulares de cerebelo no existe interacción entre ambas proteínas debido al bajo nivel de expresión de GRIP1 (datos no mostrados), por lo que decidimos continuar estudiando la interacción del receptor AMPA con las Src-quinasas. Estas proteínas presentan una expresión muy abundante en cerebro, especialmente en conos de crecimiento y

en regiones postsinápticas (*Hanissian, S. H. et al., 1992; Grant, S. G. et al., 1992*) donde se agrupan con otras proteínas formando parte de los complejos multimoleculares de distintos receptores. Hasta el momento se han identificado 9 miembros de esta familia (Src, Fyn, Lyn, Blk, c-Fgr, Hck, Yes, Yrk y Lck) y, algunos de ellos (Src y Fyn), son muy abundantes en la DPS. Todas ellas poseen una estructura común que consiste en una región N-terminal con un sitio de miristilación, seguido de un dominio SH2 (*Src Homology-2*) y un dominio SH3 (*Src Homology-3*), ambos responsables de su interacción con gran número de proteínas.

Se ha visto que algunos de los miembros de las Src-quinasas se **asocian** a las subunidades de los **receptores de glutamato** (*Tezuka, T. et al., 1999; Hayashi, T. et al., 1999*) y que son capaces de modular la función de diferentes tipos de canales (*Sobko, A. et al., 1998*) y de receptores de membrana entre los que incluyen los receptores de glutamato (*Sala, C. et al., 1999; Salter, M. W., 1998; Kohr, G. et al., 1996; Grant, S. G. et al., 1992*). Se ha visto además que estas proteínas se activan por fosforilación en tirosina (*Narisawa-Saito, M. et al., 1999a*) y que su **actividad es regulada** por varios tipos de factores extracelulares entre los que se incluyen factores neuronales y factores de crecimiento como el propio **IGF-I** (*Narisawa-Saito, M. et al., 1999b; Lesort, M. et al., 1999; Iwasaki, Y. et al., 1998; Sun, X. J. et al., 1996; Courtneidge, S. A. et al., 1993*). Todos estos datos sugieren que existe la posibilidad de que algún miembro de la familia de las Src-quinasas pudiera estar actuando como mediador de la acción moduladora del IGF-I sobre los receptores de AMPA.

### **3.3.1. Interacción de la proteín-quinasa Lyn con la subunidad 2/3 del receptor de AMPA y modulación por el IGF-I**

En el apartado 3.2.2. vimos que el IGF-I es capaz de modificar el estado de fosforilación en tirosina de una proteína asociada a la subunidad 2/3 lo que podría influir en la actividad del receptor de AMPA mediante la activación de la internalización de la subunidad GluR2 u otro mecanismo desconocido.

Basándonos en esta observación hemos tratado de identificar moléculas que pudieran actuar como mediadoras de la acción del IGF-I. Para ello nos hemos centrado en proteínas que, como Lyn, se fosforilan en residuos de tirosina, que se asocian a las subunidades de los receptores de glutamato formando complejos multimoleculares y que son susceptibles de ser moduladas por el IGF-I a través de su sistema de señalización intracelular.

**Lyn** es una proteína de la familia de las Src-quinasas que se ha visto que interacciona específicamente con la subunidad 2 del receptor de AMPA (Hayashi, T. et al., 1999). La activación de este receptor induce un aumento en la actividad de Lyn lo que, a su vez, produce una activación de diferentes proteínas de la ruta de la MAP-quinasa.

Con el fin de estudiar si la proteína-tirosín quinasa Lyn podía estar actuando como mediadora, directa o indirecta, de los efectos del IGF-I sobre el receptor AMPA inicialmente realizamos una inmunoprecipitación de la proteína Lyn mediante un anticuerpo específico comprobando que, al igual que lo observado por el grupo de Yamamoto (Hayashi, T. et al., 1999), existe una **asociación** entre la tirosín-quinasa **Lyn** y la **subunidad 2/3** del receptor de AMPA (ver figura 10, apartado A). Empleando un anticuerpo específico contra la subunidad 2/3 realizamos también la inmunoprecipitación opuesta, confirmando la asociación entre ambas proteínas (figura 10, apartado B). Tras 5 minutos de estimulación con **IGF-I** podemos constatar que este factor trófico, a la concentración utilizada, **no** modifica la **asociación** entre **Lyn** y **GluR2/3** (ver figura 10, apartado C).

Posteriormente realizamos una serie de experimentos con objeto de ver si el IGF-I era capaz de inducir una modificación del nivel de fosforilación en tirosina de Lyn. Como hemos visto las proteínas de la familia de las Src-quinasas, como Lyn, se activan por fosforilación en tirosinas por lo que una modificación de su nivel de fosforilación induciría una modificación de su actividad lo que, a su vez, podría estar afectando a la actividad del receptor de AMPA. Tras 5 minutos de estimulación observamos que, al igual que vimos en el apartado 3.2.2., el IGF-I aumenta el nivel de fosforilación en tirosina de una

proteína asociada a la subunidad 2/3 del receptor de AMPA y que, en paralelo, induce un aumento en el nivel de fosforilación en tirosina de Lyn o de alguna proteína asociada a ella (figura 11, apartado A). Cuando realizamos la inmunoprecipitación opuesta empleando un anticuerpo contra Lyn podemos ver que el IGF-I **no modifica** el nivel de **fosforilación basal** en tirosinas de **Lyn** (figura 11, apartado B) por lo que este factor trófico no induciría la fosforilación de esta Src-quinasa sino de una proteína asociada a ella. Hay que destacar que Lyn presenta un nivel **de fosforilación basal elevado** lo que podría explicar la falta de efecto observada ya que se encontraría activa de forma constitutiva (figura 11, apartado B).

Mediante esta serie de experimentos podemos concluir que:

- Existe una asociación entre la tirosín-quinasa Lyn y la subunidad 2/3 del receptor AMPA.
- El IGF-I no modifica esta asociación ni modifica el nivel de fosforilación basal de la proteína Lyn.
- Al igual que en el caso de la subunidad 2/3 del receptor de AMPA, el IGF-I incrementa el nivel de fosforilación en tirosina de una proteína asociada a la proteína Lyn. Esto podría tener un efecto modulador sobre la actividad de Lyn y/o sobre la actividad de la subunidad 2/3 del receptor de AMPA.

### **3.3.2. Interacción de la proteín-quinasa Fyn con la subunidad 2/3 del receptor de AMPA y modulación por el IGF-I**

**Fyn**, al igual que Lyn, es una proteína de la familia de las Src tirosín-quinazas que se localiza en la DPS y que se ha visto que interacciona con gran número de proteínas entre las que se incluyen las subunidades de los receptores

de glutamato con los que se asocia formando complejos. Dentro del sistema nervioso se ha descrito que Fyn es capaz de regular la expresión de distintos tipos de receptores entre los que se encuentran los receptores de AMPA (Narisawa-Saito, M. *et al.*, 1999b), así como es capaz de modular la actividad de gran número de receptores y canales iónicos (Sala, C. *et al.*, 1999; Sobko, A. *et al.*, 1998; Kohr, G. *et al.*, 1996). En el caso de los receptores de glutamato se ha observado que existe una interacción, mediada por PSD-95, entre Fyn y las subunidades NR1 y NR2A del receptor de NMDA (Tezuka, T. *et al.*, 1999) y que Fyn produce una modulación de su actividad por fosforilación en tirosina de sus subunidades. Se ha visto también que el ratón mutante (Knock Out) para Fyn presenta alteraciones en la LTP y la memoria espacial, lo que sugiere la participación de Fyn en procesos de plasticidad sináptica en los que están implicados los receptores de glutamato (Grant, S. G. *et al.*, 1992).

La actividad de Fyn está regulada, entre otros factores, por el IGF-I (Narisawa-Saito, M. *et al.*, 1999b; Iwasaki, Y. *et al.*, 1998; Sun, X. J. *et al.*, 1996; Courtneidge, S. A. *et al.*, 1993). Se ha visto que este factor trófico es capaz de modular a Fyn facilitando su asociación con el IRS-1 con el que forma un complejo capaz de regular mediante fosforilación en tirosina a diferentes proteínas entre las que se incluye la serín/treonín-quinasa GSK-3 $\beta$  (Lesort, M. *et al.*, 1999).

Puesto que Fyn se asocia a los receptores de glutamato y su actividad es regulada por el IGF-I decidimos determinar su posible papel como molécula mediadora, directa o indirecta, de los efectos moduladores del IGF-I. Para ello diseñamos una serie de experimentos que fueron realizados en las mismas condiciones que en los casos anteriores.

Empleando un anticuerpo específico realizamos una inmunoprecipitación de la proteína **Fyn** comprobando que esta tirosín-quinasa **co-inmunoprecipita** con la **subunidad 2/3** del receptor AMPA pero no con las subunidades 1 y 6 de los receptores de AMPA y de Kainato, respectivamente (ver figura 12, apartado A). La inmunoprecipitación opuesta empleando un anticuerpo específico contra la subunidad GluR2/3 confirma la asociación entre ambas proteínas (figura 12,



apartado B). Al igual que en el caso de Lyn, tras 5 minutos de estimulación con **IGF-I no** se produjo ninguna **modificación de la asociación** entre Fyn y GluR2/3 (ver figura 12, apartado C)

Posteriormente realizamos una serie de experimentos con objeto de determinar si el IGF-I era capaz de inducir una modificación del nivel de fosforilación en tirosina de Fyn, lo que estaría modificando su actividad y podría estar influyendo en la actividad del receptor de AMPA. Al igual que en el caso de Lyn, tras 5 minutos de estimulación con IGF-I  $10^{-7}$  M se produjo un incremento en el nivel de fosforilación en tirosinas de una proteína asociada a la subunidad 2/3 del receptor de AMPA así como un aumento en el nivel de fosforilación en tirosina de la proteína Fyn o de alguna proteína asociada a ella (figura 13, apartado A). Sin embargo, al inmunoprecipitar Fyn con un anticuerpo específico, pudimos comprobar que el IGF-I realmente está induciendo una reducción del nivel de fosforilación en tirosinas de la proteína Fyn respecto a su nivel de fosforilación basal, lo que podría tener un efecto inhibitor sobre esta Src-quinasa (ver figura 13, apartado B). El IGF-I por lo tanto estaría produciendo la activación simultánea de una quinasa y una fosfatasa ya que, en paralelo, está induciendo tanto una reducción del nivel de fosforilación en tirosinas de Fyn como un incremento sustancial de la fosforilación en tirosinas de una proteína desconocida asociada a Fyn.

Mediante esta serie de experimentos podemos concluir que:

- Existe una asociación entre la tirosín-quinasa Fyn y la subunidad 2/3 del receptor AMPA. Esta asociación es específica y no se produce con otras subunidades estudiadas (GluR1 y GluR6).
- El IGF-I no modifica la asociación entre GluR2/3 y Fyn aunque sí que modifica el nivel de fosforilación de la proteína Fyn, disminuyéndolo respecto a su nivel de fosforilación basal. Esto podría tener un efecto inhibitor de la actividad de Fyn.

- Sin embargo, al igual que hemos visto en el caso de Lyn, el IGF-I aumenta el nivel de fosforilación en tirosina de una proteína desconocida asociada a la proteína Fyn lo que podría tener un efecto modulador sobre la actividad de Fyn y/o sobre la actividad del receptor de AMPA.

### **3.3.3. Interacción de la proteína-quinasa GSK-3 $\beta$ con la subunidad 2/3 del receptor de AMPA y modulación por el IGF-I**

Como vimos en la introducción, uno de los posibles mecanismos de regulación de la disponibilidad de receptores en la región postsináptica es la reestructuración de esta zona mediante cambios en el citoesqueleto celular. De forma general, el citoesqueleto está formado por microtúbulos y microfilamentos y los cambios estructurales se deben a procesos de polimerización/despolimerización de las proteínas que forman estos dos tipos de elementos. Asociadas a los microtúbulos hay toda una serie de proteínas (MAPs, proteína Tau, etc.) que regulan su estabilidad y cuya modificación provoca cambios estructurales en el citoesqueleto. Los microtúbulos y los microfilamentos también se regulan por procesos de fosforilación/desfosforilación (*Tseng, H. C. et al., 1999; Julien, J. P. et al., 1998*).

Datos recientes indican que la proteína Tau y la MAP-1B son dos de los sustratos fisiológicos de la serín/treonín-quinasa GSK-3 $\beta$  (*Glycogen Syntase Kinase-3*). Esta proteína que inicialmente se identificó como una serín/treonín-quinasa capaz de inactivar a la glucógeno sintetasa por fosforilación en serinas, se expresa en grandes cantidades en el cerebro donde se ha visto que fosforila a un gran número de sustratos entre los que se incluyen la PKA, algunos factores de transcripción, la sinapsina-I, el inhibidor 2 de la fosfatasa PP1, etc (*Leroy, K. et al., 1999*). En relación con la MAP-1B y la proteína Tau, su fosforilación por efecto de la GSK-3 $\beta$  reduce su capacidad de unirse y estabilizar

microtúbulos, produciendo una desestabilización del citoesqueleto (Goold, R. G. et al., 1999; Utton, M. A. et al., 1997).

La actividad de la GSK-3 $\beta$  se regula tanto por fosforilación en tirosinas (se activa) como en serinas (se inhibe) y, en neuronas, tanto la insulina como el IGF-I juegan un importante papel en su regulación. Se ha visto que ambos factores tienen un doble efecto ya que, a tiempos cortos de estimulación, inducen una fosforilación en tirosinas de GSK-3 $\beta$  dependiente de Fyn produciendo su activación mientras que, a tiempos largos de estimulación, inducen una fosforilación en serinas produciendo su inactivación (Lesort, M. et al., 1999). En relación con el IGF-I, se conoce desde hace tiempo que tanto Akt (PKB) como p70 S6 quinasa fosforilan en serinas a GSK-3 $\beta$  produciendo su inactivación (Shaw, M. et al., 1997; Cui, H. et al., 1998).

Diseñamos una serie de experimentos con objeto de determinar si la proteína GSK-3 $\beta$  podía estar actuando como mediadora de la depresión inducida por el IGF-I sobre el receptor de AMPA ya que la modulación de GSK-3 $\beta$  por efecto de este factor trófico podría inducir cambios estructurales en el citoesqueleto que podrían ser responsables de la internalización de la subunidad GluR2 anteriormente descrita.

Inicialmente realizamos una inmunoprecipitación de la proteína GSK-3 $\beta$  mediante un anticuerpo específico observando que esta serín/treonín quinasa co-inmunoprecipita con la subunidad 2/3 del receptor de AMPA (ver figura 14, apartado A). La inmunoprecipitación opuesta empleando un anticuerpo específico contra la subunidad GluR2/3 confirma la asociación entre ambas proteínas (figura 14, apartado B).

En este caso, a diferencia de los anteriores, tras 5 minutos de estimulación con IGF-I  $10^{-7}$  M se produjo una reducción de la asociación entre GSK-3 $\beta$  y GluR2/3 (ver figura 14, apartado C). Este efecto, sin embargo, es transitorio ya que, tras 15 minutos de estimulación con IGF-I, la asociación entre GluR2/3 y GSK-3 $\beta$  no se modifica respecto a la situación control. Esta disociación de la subunidad 2/3 y GSK-3 $\beta$  podría estar afectando directamente a

la actividad del receptor de AMPA ya que, como vimos en la introducción, la actividad de los receptores y canales iónicos se modula, entre otros mecanismos, por modificación de las interacciones proteína-proteína.

Posteriormente quisimos determinar si el IGF-I era capaz de inducir una modificación del nivel de fosforilación en tirosinas de GSK-3 $\beta$ . Aunque algunos autores han descrito que la forma activa de la GSK-3 $\beta$  se encuentra fosforilada en tirosinas (*Bhat, R. V. et al., 2000*) en nuestro sistema la GSK-3 $\beta$  no está fosforilada de forma constitutiva (ver figura 15, apartado B). El IGF-I por su parte no produce modificación alguna ni del nivel de fosforilación basal en tirosinas de la GSK-3 $\beta$  ni de ninguna proteína asociada a ella (figura 15, apartado A).

Mediante esta serie de experimentos podemos concluir que:

- Existe una asociación entre la serín/treonín-quinasa GSK-3 $\beta$  y la subunidad 2/3 del receptor AMPA.
- El IGF-I produce la disociación rápida y transitoria de GSK-3 $\beta$  y la subunidad GluR2/3.
- El IGF-I no produce ninguna modificación del nivel de fosforilación en tirosina de GSK-3 $\beta$  o de alguna proteína asociada a ella.

## DISCUSIÓN

---

### 1. OBJETO DEL ESTUDIO

A través del presente trabajo de tesis hemos tratado de caracterizar el efecto neuromodulador del IGF-I sobre los receptores de glutamato de células granulares de cerebelo así como hemos intentado dilucidar el posible mecanismo a través del cual este factor trófico produce dicha modulación.

Al inicio de este estudio tan sólo existían algunas observaciones indirectas que apoyaban la hipótesis de una posible acción neuromoduladora del IGF-I sobre la actividad de los receptores y canales iónicos en el sistema nervioso central. En relación con los receptores de glutamato, no existía ninguna evidencia directa que relacionara al IGF-I con su modulación.

Mediante este trabajo hemos demostrado que el IGF-I es capaz de modular de forma diferencial la actividad de los distintos tipos de receptores ionotrópicos de glutamato presentes en las células granulares de cerebelo. Esta modulación es rápida (inferior a 3 minutos) y específica para cada tipo de receptor. También hemos identificado toda una serie de nuevas proteínas que se asocian al receptor de AMPA y que son susceptibles de ser moduladas por efecto del IGF-I. Asimismo hemos descrito un posible mecanismo mediador del efecto del IGF-I a través de un proceso de internalización de algunas subunidades de los receptores de AMPA. Parte de nuestros resultados han sido confirmados posteriormente por varios grupos lo que apoya la validez de nuestras observaciones.

Según nuestro conocimiento, esta es la primera observación de un efecto regulador de la función de un receptor por modulación simultánea de numerosos eventos (internalización, fosforilación/desfosforilación y asociación/disociación de proteínas) por la influencia de un único modulador: el IGF-I.

## 2. MODULACIÓN POR IGF-I DE LA ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO

Todos nuestros resultados indican que, al margen de sus funciones clásicas como factor trófico, el IGF-I tiene un efecto modulador de la actividad de los receptores ionotrópicos de glutamato en células granulares de cerebelo. Esta modulación tendría una enorme importancia funcional debido al gran número de procesos en los que participan estos receptores entre los que se incluyen procesos de aprendizaje y memoria en el individuo adulto.

Los factores neurotróficos regulan gran variedad de procesos durante el desarrollo del sistema nervioso aunque sus efectos en el cerebro adulto están poco caracterizados. Desde hace tiempo se sabe que el IGF-I tiene potentes efectos sobre las propiedades de señalización de las neuronas sobre las que actúa y que su producción está regulada por la actividad neuronal. Sin embargo, al inicio de este estudio, no existía ningún dato que relacionara al **IGF-I** con la modulación de la actividad de los **receptores de glutamato**. En el caso de otros factores tróficos como las neurotrofinas sí que se habían descrito efectos moduladores sobre las respuestas de estos receptores en diferentes estructuras cerebrales (*Levine, E. S. et al., 1998; Carmignoto, G. et al., 1997; Lessmann, V. et al., 1994*). En el caso del IGF-I se sabía que era capaz de modular la actividad de varios tipos de canales iónicos como los **canales de potasio** (*Sakuta, H., 1994*) y los **canales de calcio** (*Chik, C. L. et al., 1997; Blair, L. A. et al., 1997; Kleppisch, T. et al., 1992*), sobre los que podía tener efectos distintos según el tipo celular.

En nuestro modelo hemos podido constatar que, excepto en el caso de los receptores de NMDA, el IGF-I produce una modulación **rápida y específica** para cada tipo de receptor ionotrópico de glutamato presente en las células granulares de cerebelo. Este efecto diferencial no es exclusivo del IGF-I sino que varios autores han observado que otros factores tróficos como las neurotrofinas también son capaces de inducir en un único tipo celular una modulación

diferente para cada tipo de receptor de glutamato. Se ha visto, por ejemplo, que el BDNF en neuronas de hipocampo es capaz de inducir una potenciación de la transmisión sináptica a través los receptores de NMDA, produciendo simultáneamente una depresión de las respuestas de los receptores de AMPA (Song, D. K. et al., 1998). Otros autores han observado, tanto en cultivos de células de hipocampo como de corteza, que el BDNF es capaz de producir una potenciación de los receptores de NMDA y no producir ningún efecto sobre los receptores de AMPA (Lessmann, V., 1998a).

Según nuestras observaciones, el IGF-I induce una **depresión** de las respuestas del receptor de **AMPA**, una **potenciación** de las respuestas del receptor de **Kainato** y no tiene **ningún efecto** sobre la actividad del receptor de **NMDA**. En el caso del **receptor de AMPA** se ha comprobado que otros factores tróficos son capaces de producir una depresión similar a la inducida por el IGF-I. Se ha visto que el BDNF produce una inhibición de las corrientes de AMPA tanto en neuronas de hipocampo (Song, D. K. et al., 1998) como en neuronas sensoriales (Balkowiec, A. et al., 2000). Muy recientemente parte de nuestros resultados han sido confirmados por los grupos de Wang y Linden que han observado que, tanto la insulina como el IGF-I, producen una depresión de las respuestas del receptor de AMPA en células de hipocampo (Man, Y. H. et al., 2000) y en células de Purkinje (Wang, Y. T. et al., 2000). Ambos grupos han demostrado que este efecto modulador es específico para el receptor de AMPA ya que el IGF-I no produce ninguna modulación de la actividad del receptor de NMDA lo que concuerda con nuestros resultados.

En relación con el receptor de **Kainato**, hasta la fecha no existe ninguna evidencia que relacione a los factores tróficos con la modulación de este tipo de receptores por lo que ésta es una de las primeras evidencias al respecto. Como pudimos comprobar mediante los experimentos de bloqueo de la ruta de señalización del IGF-I, la potenciación de las respuestas del receptor de Kainato inducida por este factor trófico es dependiente tanto de la activación del propio receptor de IGF-I como de la activación de la PI3-quinasa, e independiente de la activación de la MAP-quinasa. Esta dependencia de la PI3-quinasa ya se había

visto anteriormente en el caso de otros efectos moduladores mediados por el IGF-I como es la modulación de la actividad de los canales de calcio de tipo N y L de células granulares de cerebelo (*Blair, L. A. et al., 1999; Blair, L. A. et al., 1997*). Según nuestro conocimiento esta es la primera observación de que la PI3-quinasa está implicada en la modulación de los receptores ionotrópicos de glutamato. Sin embargo es necesario realizar más estudios para comprobar si esta proteína-quinasa fosforila directamente a las subunidades de los receptores de Kainato o a alguna proteína asociada a ellas.

Respecto a los receptores de tipo **NMDA**, según nuestras observaciones, el IGF-I no tiene ningún efecto modulador sobre ellos. Este resultado ha sido confirmado por los grupos de Wang y Linden (*Man, Y. H. et al., 2000; Wang, Y. T. et al., 2000*) que han observado que, tanto la insulina como el IGF-I, no producen ningún efecto sobre la actividad del receptor de NMDA. Por el contrario otros autores han observado que la insulina produce una potenciación de las corrientes iónicas de receptores NMDA clonados en oocitos (*Liu, L. et al., 1995*). Estos autores han visto además que este efecto modulador de la insulina es dependiente de la combinación de subunidades del receptor de NMDA, existiendo algunas combinaciones sobre las que la insulina no produce ningún efecto. Es posible, por lo tanto, que la combinación de subunidades del receptor de NMDA presente tanto en células granulares de cerebelo como en células de hipocampo (*Man, Y. H. et al., 2000*) y en células de Purkinje (*Wang, Y. T. et al., 2000*), origine un receptor funcional insensible a la modulación por insulina e IGF-I lo que explicaría la diferencia de efecto.

Por lo tanto el IGF-I, al igual que otros factores tróficos, podría actuar como modulador sináptico produciendo una regulación diferencial de la actividad de los receptores ionotrópicos de glutamato. A través de dicha modulación el IGF-I podría estar mediando procesos de plasticidad sináptica en el cerebelo de manera análoga a como recientemente se ha observado en células de Purkinje (*Wang, Y. T. et al., 2000*). Esta modulación podría ser dependiente tanto de la composición de receptores de la célula diana como de la estructura y composición de subunidades de dichos receptores por lo que un mismo factor



tráfico (el IGF-I) podría producir distintos efectos en células similares, así como podría producir el mismo efecto sobre células de distintas áreas pero con una composición parecida de receptores.

**CONCLUSIÓN:** El **IGF-I** produce una **modulación diferencial** de los receptores **ionotrópicos** de **glutamato** presentes en células granulares de cerebelo.

### 3. MODULACIÓN DE LA DISPONIBILIDAD DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA INDUCIDA POR IGF-I

Recientemente se ha visto que los mecanismos de regulación de la disponibilidad de receptores en la célula postsináptica son procesos que se regulan muy rápidamente y que podrían estar mediando mecanismos de plasticidad sináptica a corto plazo (*Carroll, R. C. et al., 1999; Turrigiano, G. G., 2000*). La disponibilidad de receptores en la membrana celular se puede regular mediante procesos de endocitosis/exocitosis a través de la formación de vesículas recubiertas de clatrina y/o mediante procesos de reorganización de la membrana plasmática debido a cambios morfológicos producidos por variaciones en el citoesqueleto.

Empleando anticuerpos que reconocen un epítipo extracelular de la subunidad GluR2 del receptor de AMPA hemos podido comprobar que el IGF-I produce una rápida reducción del número de subunidades presentes en la membrana plasmática. Esta disminución del número de subunidades va acompañada en paralelo por un incremento en la cantidad de receptor presente en la fracción citoplásmica, lo que sugiere que se está produciendo una **internalización** de esta subunidad. Actualmente se sabe que la mayor parte de las proteínas integrales de la membrana plasmática se desplazan al compartimento intracelular mediante procesos de exocitosis/endocitosis dependientes de la formación de vesículas recubiertas de clatrina (*Man, Y. H. et al., 2000; Turrigiano, G. G., 2000*) por lo que es muy probable que la internalización mediada por el IGF-I se produzca a través de un proceso de este tipo. En nuestro sistema el glutamato induce una internalización con un curso temporal similar al del IGF-I.

La disponibilidad de receptores funcionales en la membrana plasmática tiene importantes implicaciones en la función sináptica. Este proceso de internalización de receptores de glutamato dependiente de actividad podría ser uno de posibles los mecanismos que expliquen el efecto modulador del IGF-I

sobre la actividad de los receptores de glutamato en las células granulares de cerebelo. La rápida internalización de la subunidad GluR2 inducida por el IGF-I en nuestro modelo debe conducir a un descenso en el número de receptores de AMPA situados en la membrana plasmática o a una variación de su funcionalidad. La depresión de la actividad del receptor de AMPA inducida por el IGF-I podría ser explicada mediante un proceso de internalización de este tipo. Sin embargo la potenciación que IGF-I induce sobre las respuestas de los receptores de Kainato es difícilmente explicable a través de un mecanismo de internalización de éstos receptores.

Hasta hace muy poco tiempo no existían evidencias que relacionaran al IGF-I con la modulación del número de canales iónicos y receptores en la membrana plasmática. Recientemente se ha visto en células CHO-K1 transfectadas con un canal de calcio regulado por factores de crecimiento (*Growth-factor Regulated Channel*, **GRC**), que el IGF-I es capaz de activar la translocación de este canal desde vesículas intracelulares hasta la membrana plasmática lo que va acompañado de un incremento de su actividad (*Kanzaki, M. et al., 1999*). En el caso de la insulina se ha visto que induce la translocación del transportador de glucosa-4 (GLUT-4) desde una reserva intracelular a la membrana plasmática (*Holman, G. D. et al., 1997*) y que, tanto en células HEKs transfectadas como en cultivos de células de hipocampo, es capaz de inducir una rápida translocación del canal de GABA<sub>A</sub> desde compartimentos intracelulares hasta la membrana plasmática produciendo un incremento duradero de la transmisión sináptica mediada por dicho receptor (*Wan, Q. et al., 1997*). En el cerebro los efectos de la insulina y el IGF-I son difíciles de diferenciar ya que ambos factores poseen unos receptores con un alto grado de homología que comparten las mismas rutas de señalización intracelular a través de un dominio tirosín-quinasa (*Avruch, J., 1998; Heidenreich, K. A., 1993*). Ambos receptores son capaces de unir tanto IGF-I como insulina (aunque con mucha menor afinidad) por lo que pueden presentar activación cruzada.

Recientemente parte de nuestros resultados han sido confirmados por los grupos de Wang y Linden que han comprobado en cultivos de células de

hipocampo y de células de Purkinje que, tanto la insulina como el IGF-I, producen una rápida internalización de la subunidad GluR2 del receptor de AMPA (Man, Y. H. et al., 2000; Wang, Y. T. et al., 2000). Como resultado de dicha internalización se produce una **depresión** duradera de la respuesta del receptor de **AMPA** similar a la obtenida por nosotros por efecto del IGF-I en células granulares de cerebelo. En estos trabajos demuestran que el efecto mediado por la insulina y el IGF-I se debe a una activación de la endocitosis y no a una inhibición de la inserción en membrana y que es un efecto dependiente de la formación de vesículas de clatrina lo que sugiere que se trata de un proceso de **endocitosis** típico. Ellos observan además que el efecto modulador es **específico** para el receptor de **AMPA** y que no se produce modulación del receptor de NMDA, lo que de nuevo concuerda con nuestros datos. Sin embargo existe discrepancia respecto a la duración del efecto ya que, en nuestro caso, la acción moduladora se mantenía durante todo el tiempo que el IGF-I estaba presente y, una vez retirado, el efecto se lavaba en parte. En estos trabajos observan que, en ambos tipos celulares, un pulso de 10 minutos de estimulación con insulina o IGF-I es suficiente para inducir un efecto que se mantiene durante más de 1 hora. Esta diferencia se puede explicar debido a diferencias intrínsecas al tipo de célula empleada ya que ellos utilizan células de hipocampo y neuronas de Purkinje en las que es posible que existan mecanismos de traducción de señal distintos a los que existen en células granulares o que tengan distinta composición cuantitativa y cualitativa de receptores de glutamato. Ambos grupos, sin embargo, observan que la internalización dependiente de insulina e IGF-I es **específica** para la **subunidad 2** del receptor de AMPA lo que, de nuevo, concuerda con nuestros datos.

Sin embargo, en contraposición a estos resultados, el grupo de Malenka y Nicoll (Carroll, R. C. et al., 1999) ha observado que tanto el AMPA como el glutamato, su ligando endógeno, producen una rápida internalización de la subunidad GluR1 (y no GluR2), produciendo, al igual que en nuestro caso, una depresión de las respuestas del receptor de AMPA. Esta internalización, sin embargo, es **dependiente** de la asociación entre **GluR2** y la proteína **NSF** (N-

*ethylmaleimide-Sensitive Fusion protein*) (Song, I. et al., 1998) lo que, de nuevo, demuestra la importancia de la subunidad 2 del receptor de AMPA en la mediación de este tipo de efectos. En conjunto todos estos datos indican que, aunque el efecto final es el mismo (depresión de las respuestas de AMPA), cada ligando (glutamato, insulina o IGF-I) es capaz de inducir la internalización de una subunidad diferente (GluR1 o GluR2) aunque, en todos los casos, la subunidad **GluR2** parece tener un **papel fundamental** en la mediación de este efecto modulador.

El **mecanismo** por el cual el IGF-I produce esta internalización está aún por dilucidar aunque se ha visto que tanto el efecto de translocación inducido por el IGF-I sobre los canales de calcio regulados por factores de crecimiento (GRCs) (Kanzaki, M. et al., 1999) como el efecto de la insulina sobre la translocación del transportador de glucosa (Holman, G. D. et al., 1997) son dependientes de la activación de la PI3-quinasa. La activación de esta proteína-quinasa por efecto del IGF-I produce la transformación del fosfatidil-inositol-4,5-difosfato en fosfatidil-inositol-3,4,5-difosfato. Este fosfatidilinositol puede activar a la dinamina I, una GTPasa que tiene gran importancia en el proceso de la endocitosis por lo que podría estar estimulándolo. Nosotros, en el caso del receptor de AMPA, no disponemos de datos que demuestren esta dependencia aunque sí que hemos comprobado en el caso del **Kainato** que la potenciación inducida por el IGF-I se bloquea mediante inhibición específica de la PI3-quinasa. Como hemos visto el IGF-I es capaz de inducir tanto la internalización (Man, Y. H. et al., 2000; Wang, Y. T. et al., 2000) como la externalización (Kanzaki, M. et al., 1999) de receptores y canales iónicos por lo que la potenciación de la actividad del receptor de Kainato se podría explicar mediante un mecanismo similar (aunque opuesto) al observado para el receptor de AMPA (exocitosis). Es preciso sin embargo realizar más estudios antes de llegar a un resultado concluyente.

**CONCLUSIÓN:** El **IGF-I** produce específicamente una **internalización** de la **subunidad 2** del receptor de **AMPA** mediante un proceso de endocitosis. Esta

internalización podría ser la responsable del efecto de depresión inducido por el IGF-I sobre la actividad de dichos receptores.

#### 4. MODULACIÓN POR EFECTO DEL IGF-I DE LOS COMPLEJOS MULTIMOLECULARES ASOCIADOS AL RECEPTOR DE AMPA

En las áreas sinápticas se ha visto que los receptores de glutamato están físicamente unidos a gran número de proteínas formando complejos multimoleculares. A través de estos complejos los receptores se anclan en localizaciones específicas dentro de las sinapsis y se organizan junto a gran número de proteínas de función diversa formando una unidad física que integra numerosas vías de señalización y que permite una asociación directa con el citoesqueleto (*O'Brien, R. J. et al., 1998; Kornau, H. C. et al., 1997*).

El número de proteínas identificadas que forman parte de estos complejos multimoleculares asociados a los diferentes tipos de receptores de glutamato va en aumento (*Husi, H. et al., 2000; Braithwaite, S. P. et al., 2000*). En nuestro sistema de cultivos de células granulares de cerebelo hemos podido identificar toda una serie de nuevas proteínas asociadas a las subunidades del receptor de AMPA que podrían formar parte de estos complejos multimoleculares y que podrían estar participando en la regulación de la función de este receptor.

##### 4.1. ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA LYN CON EL RECEPTOR DE AMPA. MODULACIÓN POR IGF-I

En nuestro sistema hemos comprobado que el IGF-I es capaz de inducir una **fosforilación en tirosina** de una **proteína asociada** específicamente a la **subunidad 2/3** del receptor de **AMPA**. Es muy probable que esta fosforilación produzca una regulación de la actividad de dicha proteína lo que a su vez podría, a través de diversos mecanismos, inducir una modulación de la actividad del receptor de AMPA.

Con objeto de identificar a esta posible molécula mediadora estudiamos diversas proteínas. La proteína **Lyn** es una buena candidata a actuar como mediadora del efecto del IGF-I ya que se ha visto que algunas proteínas de la familia a la que pertenece, las Src-tirosín quinasas, se activan por factores extracelulares entre los que se incluyen los factores de crecimiento (*Narisawa-Saito, M. et al., 1999a*). Se ha visto además que esta proteína se asocia específicamente a la subunidad 2 del receptor de AMPA, cuya activación produce una modulación de la actividad de Lyn lo que, a su vez, induce una potenciación de la ruta de la MAP-quinasa (una de las dos rutas principales de acción del IGF-I) (*Hayashi, T. et al., 1999*). También se sabe que algunos miembros de la familia de las Src-tirosín quinasas modulan la función de los receptores de NMDA (*Nakazawa, T. et al., 2000; Sala, C. et al., 1999; Salter, M. W., 1998*) y de canales de potasio (*Sobko, A. et al., 1998*) y que participan en la regulación de la LTD en hipocampo (*Grant, S. G. et al., 1992*).

En nuestro sistema hemos confirmado la **asociación** descrita previamente por el grupo de Yamamoto (*Hayashi, T. et al., 1999*) entre **Lyn** y la subunidad **GluR2/3** del receptor de AMPA. Como hemos podido constatar, el IGF-I no modula ni la asociación entre GluR2/3 y Lyn, ni modifica el estado de fosforilación en tirosina de Lyn. El **IGF-I**, sin embargo, produce un **aumento** del nivel de **fosforilación** en tirosina de una **proteína desconocida** asociada a Lyn. Es muy probable, por lo tanto, que Lyn forme parte de un complejo multimolecular asociado a la subunidad 2/3 del receptor de AMPA y que, una de las proteínas de este complejo, sea susceptible de ser fosforilada por el IGF-I. La fosforilación de esta proteína desconocida podría mediar el efecto modulador del IGF-I sobre el receptor de AMPA.

Nuestros datos junto con los de otros grupos indican que es la subunidad **GluR2** la que está más directamente implicada en la regulación de la función del receptor de AMPA. En nuestro sistema hemos comprobado que, al igual que lo descrito por el grupo de Yamamoto (*Hayashi, T. et al., 1999*), la proteína Lyn se une específicamente a la subunidad GluR2/3. Se ha visto que al extremo C-terminal de la subunidad GluR2 se unen numerosas proteínas (NSF, PICK-1,





#### 4.2. ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA FYN CON EL RECEPTOR DE AMPA. MODULACIÓN POR EL IGF-I

**Fyn** es otra proteína de la familia de las Src-tirosín quinasas que, al igual que Lyn, es una buena candidata para actuar como mediadora de los efectos del IGF-I. La proteína Fyn forma parte de la DPS y se sabe que es capaz de asociarse a los receptores de glutamato ya que, recientemente, se ha descrito una asociación entre Fyn y los receptores de NMDA a través de la proteína PSD-95 (*Tezuka, T. et al., 1999; Husi, H. et al., 2000*). También se ha asociado a Fyn con la modulación de la actividad de diferentes receptores y canales iónicos, entre los que se incluyen los receptores de NMDA (*Nakazawa, T. et al., 2000; Salter, M. W., 1998*) y se ha sugerido que Fyn está participando en procesos de plasticidad sináptica, así como en procesos de aprendizaje y memoria (*Grant, S. G. et al., 1992*). Se ha visto además que la proteína Fyn es activada de forma rápida por la insulina y el IGF-I, induciendo la formación de un complejo con el IRS-1 (*Lesort, M. et al., 1999; Sun, X. J. et al., 1996*).

Inicialmente comprobamos que existe una **asociación** específica, no descrita anteriormente, entre Fyn y la subunidad GluR2/3 del receptor de AMPA. De nuevo nuestros resultados, junto con los de otros autores (*Wang, Y. T. et al., 2000; Man, Y. H. et al., 2000*), sugieren que la subunidad GluR2 tiene gran importancia en la modulación, dependiente de insulina y de IGF-I, de las respuestas del receptor de AMPA. El IGF-I sin embargo no modula la **asociación** entre GluR2/3 y Fyn aunque tiene un efecto doble y opuesto sobre el **nivel de fosforilación** en tirosina de **Fyn** (lo **reduce**) y sobre el nivel de fosforilación en tirosina de una **proteína desconocida** asociada a Fyn (lo **aumenta** al igual que ocurría en el caso de Lyn). De nuevo es muy probable que Fyn, al igual que Lyn, esté formando parte de un complejo multimolecular asociado específicamente a la subunidad 2/3 del receptor de AMPA.

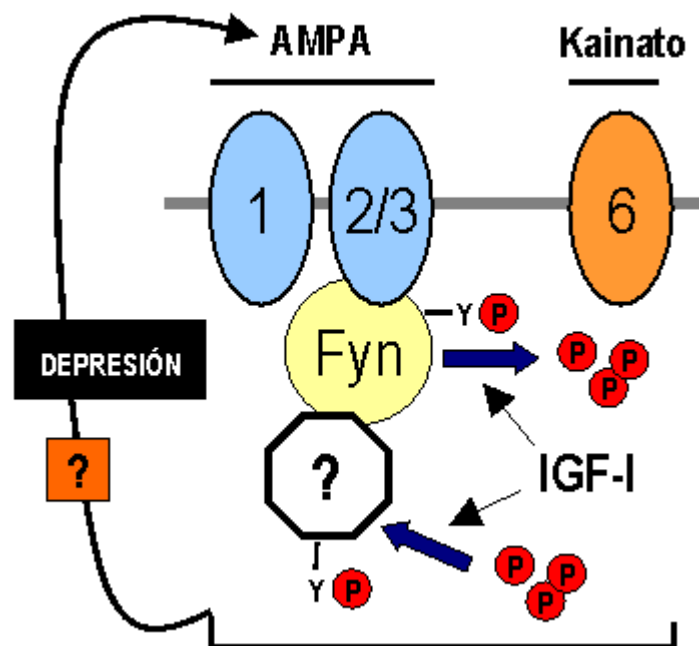
La modulación de la actividad de las proteínas asociadas al complejo multimolecular del receptor AMPA por procesos de fosforilación/desfosforilación

en tirosinas podría estar afectando, a través de un mecanismo desconocido, a la función del receptor. Se ha descrito que la actividad de Fyn se modula por fosforilación en tirosinas y se ha visto que factores tróficos como el BDNF inducen su **fosforilación** en tirosinas produciendo su **activación** (Narisawa-Saito, M. et al., 1999b) por lo que es muy probable que la **desfosforilación** en tirosinas de Fyn inducida por el **IGF-I** esté produciendo una **inhibición** de su actividad basal (aunque hemos de realizar más experimentos para demostrar dicha inhibición). De confirmarse, la inhibición de Fyn podría afectar a diferentes procesos intracelulares que, como efecto final, podrían conducir a la modulación de la actividad del receptor AMPA. Este resultado, sin embargo, está en contraposición con lo descrito por otros grupos ya que se ha visto que la **insulina** produce una **activación** de **Fyn** mediante la formación de un complejo con IRS-1 (Sun, X. J. et al., 1996), y que el propio **IGF-I** a tiempos cortos de estimulación (inferiores a 2 minutos) induce una **activación** de **Fyn**, facilitando su unión con IRS-1 (Lesort, M. et al., 1999). Estos experimentos han sido realizados, respectivamente, en células CHO transfectadas con IRS-1 y Fyn (Sun, X. J. et al., 1996) y en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) (Lesort, M. et al., 1999). En nuestro modelo no hemos encontrado ninguna asociación entre Fyn e IRS-1 inducida por el IGF-I a tiempos cortos de estimulación (datos no mostrados) por lo que es muy probable que la situación en células granulares primarias de cerebelo sea muy diferente lo que explicaría las discrepancias observadas.

Muy recientemente se ha visto en células granulares de cerebelo que la modulación inducida por el **IGF-I** de los canales de calcio de tipo N y L requiere la fosforilación en tirosina de una de las subunidades del canal y que, este efecto modulador, es dependiente de la activación de las **Src-tirosín quinasas** (Bence-Hanulec, K. K. et al., 2000). Todo esto nos hace pensar que, independientemente de que la posible inhibición por desfosforilación de Fyn pudiera estar participando en la modulación del receptor de AMPA, es posible que sea otra proteína de la familia de las Src quinasas la que pudiera estar actuando como mediadora del efecto modulador del IGF-I. En el cerebro se ha

visto que otras proteínas de la familia de las Src-quinasas diferentes a Lyn y Fyn también participan en la modulación de los receptores de glutamato y en otros procesos plásticos (Kohr, G. et al., 1996; Courtneidge, S. A. et al., 1993).

**CONCLUSIÓN:** La proteína **Fyn** se asocia **específicamente** a la **subunidad 2/3** del receptor de AMPA. El IGF-I induce un **descenso** en el nivel de fosforilación en tirosinas de **Fyn** al tiempo que induce un **incremento** de fosforilación en tirosinas de una **proteína asociada a Fyn** lo que podría conducir, por diversos mecanismos, a una modificación de la actividad del receptor de AMPA.



**Discusión, figura 2:** Asociación de Fyn con el receptor de AMPA y modulación por IGF-I.

#### 4.3. ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA GSK-3 $\beta$ CON EL RECEPTOR DE AMPA. MODULACIÓN POR EL IGF-I

La GSK-3 $\beta$  es una serín/treonín quinasa que modula a elementos de citoesqueleto y que, al igual que Lyn y Fyn, podría ser una buena candidata para actuar como mediadora de los efectos del IGF-I. Su actividad se regula tanto por fosforilación en serina como en tirosina y su modulación está muy ligada a la ruta de señalización intracelular del **IGF-I** ya que se ha descrito que tanto Akt (PKB) como p70 S6 quinasa la fosforilan en serinas induciendo su **inactivación** (Shaw, M. et al., 1997; Cui, H. et al., 1998).

Inicialmente pudimos observar que existe una **asociación**, no descrita anteriormente, entre **GSK-3 $\beta$**  y la subunidad **GluR2/3** del receptor de AMPA. También en este caso una proteína con una posible función reguladora (la GSK-3 $\beta$ ) interacciona con la subunidad 2/3 lo que, de nuevo, apoya la hipótesis de que es la subunidad GluR2 la principal responsable de la modulación de los receptores AMPA.

En nuestro sistema el **IGF-I** no produce ninguna modificación del nivel basal de fosforilación en tirosinas de GSK-3 $\beta$  ni de ninguna proteína asociada a ella aunque sí que induce con un curso temporal rápido (5 minutos) la **disociación** de la proteína **GSK-3 $\beta$**  de la subunidad **2/3**. A tiempos más largos el IGF-I no tiene ningún efecto sobre la asociación lo que indica que es una acción rápida y transitoria. Un efecto transitorio similar a éste se ha observado también en células de neuroblastoma humano en las que, tanto el IGF-I como la insulina, tienen un doble efecto sobre la actividad de la GSK-3 $\beta$ , inhibiéndola a tiempos largos de estimulación por fosforilación en serinas y activándola a tiempos cortos (inferiores a dos minutos) mediante un proceso de fosforilación en tirosinas dependiente de la proteína Fyn (Lesort, M. et al., 1999). Estos autores observan además que a tiempos superiores a dos minutos de estimulación el IGF-I no produce ninguna modificación de la fosforilación basal en tirosinas de la GSK-3 $\beta$  lo que está de acuerdo con lo observado en nuestro sistema.

Aunque nuestros datos junto con los de otros autores (*Man, Y. H. et al., 2000; Wang, Y. T. et al., 2000*) sugieren que la modulación de la actividad del receptor de AMPA por efecto del IGF-I podría estar mediada por un mecanismo de endocitosis típico, no podemos descartar la participación de otros procesos como la modulación de interacciones proteína-proteína y la reorganización de la zona postsináptica por modificaciones del citoesqueleto.

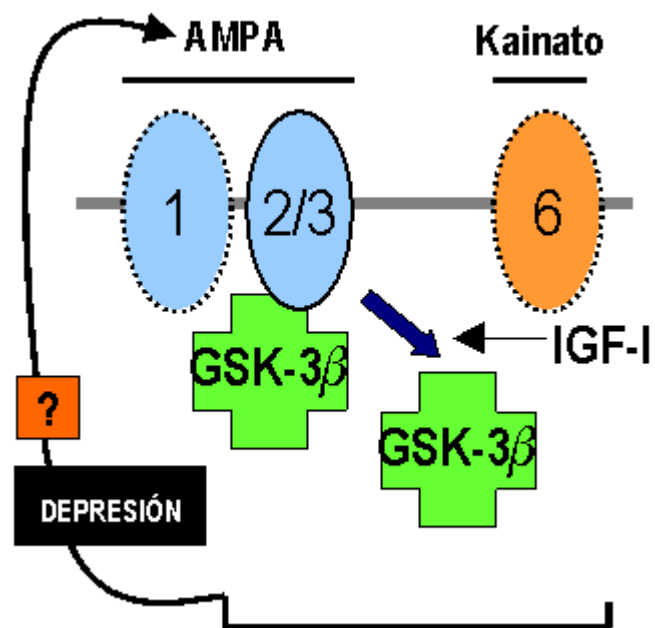
La disociación de GSK-3 $\beta$  y GluR2/3 por efecto del IGF-I podría estar modulando directamente la actividad del receptor AMPA ya que los cambios en la interacción de unas proteínas con otras modulan su función. En el caso de los receptores de glutamato se ha visto, por ejemplo, que la modificación de la unión de GluR2 con NSF produce una rápida reducción (de un 30 a un 40%) de la amplitud de las corrientes de AMPA (*Song, I. et al., 1998; Lin, J. W. et al., 1998*). En nuestro caso, la reducción del 30% observada en las respuestas de los receptores de AMPA por efecto del IGF-I podría estar mediada por un mecanismo similar debido a la reducción de la asociación GSK-3 $\beta$ /GluR2/3, aunque es necesario hacer más experimentos para demostrarlo.

La función de ciertos receptores también se puede modular modificando su disponibilidad debido a una reorganización de la zona postsináptica por cambios rápidos en el citoesqueleto (*Fischer, M. et al., 1998; Fischer, M. et al., 2000; Shi, S. H. et al., 1999*). Dos de los sustratos fisiológicos de la GSK-3 $\beta$  son la proteína Tau y la MAP-1B. Ambas proteínas son fosforiladas por la GSK-3 $\beta$ , reduciendo su capacidad de estabilizar a los microtúbulos y produciendo una desestabilización del citoesqueleto (*Tseng, H. C. et al., 1999; Julien, J. P. et al., 1998*). Los cambios en el citoesqueleto conducen a cambios morfológicos que podrían estar implicados en el efecto modulador del IGF-I sobre los receptores de AMPA. Sin embargo no se ha descrito que intervengan en el proceso de internalización de proteínas integrales de membrana por lo que no podrían explicar la internalización de GluR2 inducida por el IGF-I observada en nuestro sistema aunque sí que podrían estar participando en la modulación de su función. Asimismo la GSK-3 $\beta$  no es la única proteína asociada a los receptores de glutamato que produce la modulación del citoesqueleto sino que se ha visto

una relación entre la proteína Tau y las Src-quinasas e incluso en neuroblastoma se ha observado que Fyn es capaz de inducir una fosforilación de Tau provocando cambios en el citoesqueleto (Lee, G. *et al.*, 1998). Este efecto es dependiente de otro factor trófico, el NGF, lo que sugiere que el IGF-I también podría estar induciendo cambios rápidos en el citoesqueleto a través de la modulación de Src-tirosín quinasas .

Recientemente se ha visto que el litio, uno de los principales inhibidores de la GSK-3 $\beta$ , produce una modulación de la función de los receptores de glutamato (Karkanias, N. B. *et al.*, 1999). El efecto del litio es diferencial ya que produce una potenciación de las respuestas del receptor de AMPA y deprime las respuestas del receptor de Kainato. Este efecto es semejante, aunque en sentido opuesto, al producido por el IGF-I sobre las respuestas de los receptores de glutamato (depresión de las respuestas de AMPA y potenciación de las respuestas de Kainato). Estos autores sugieren que el efecto del litio podría deberse a una modificación del mecanismo de desensibilización del propio receptor y no plantean la posibilidad de que sea un efecto directo sobre la actividad de GSK-3 $\beta$ . Sin embargo estos resultados sugieren que factores que regulan la actividad de la GSK-3 $\beta$  como el litio o el IGF-I podrían estar modulando de forma diferencial la actividad de los receptores de glutamato.

**CONCLUSIÓN:** La proteína **GSK-3 $\beta$**  se asocia a la **subunidad 2/3** del receptor de AMPA. El IGF-I produce una **disociación** de la proteína **GSK-3 $\beta$**  y la subunidad **GluR2/3** lo que podría conducir, mediante un mecanismo desconocido, a una modificación de la actividad del receptor de AMPA.



**Discusión, figura 3:** Asociación de GSK-3 $\beta$  con el receptor de AMPA y modulación por IGF-I.



## 5. MODULACIÓN DE RECEPTORES DE GLUTAMATO DEPENDIENTE DE IGF-I: SIGNIFICADO FUNCIONAL

El cerebro tiene la capacidad plástica de adaptarse a las condiciones del entorno mediante varios mecanismos entre los que se incluyen los cambios en la eficacia de las conexiones sinápticas. Actualmente hay un número creciente de evidencias que indican que estos cambios a medio y largo plazo en la eficacia de las sinapsis están en la base de los procesos de aprendizaje y memoria. Como hemos visto, en la mayor parte de los procesos de plasticidad sináptica están implicados, de un modo u otro, los receptores de glutamato por lo que la modulación de dichos receptores podría estar mediando procesos cognitivos (*Bortolotto, Z. A. et al., 1999a; Zamanillo, D. et al., 1999; Bortolotto, Z. A. et al., 1999b; Roche, K. W. et al., 1994*). Los fenómenos de la potenciación duradera o LTP y la depresión duradera o LTD son dos de los modelos mejor estudiados de aprendizaje y memoria a nivel molecular. En ellos se produce una variación a largo plazo de la eficacia de la transmisión sináptica excitatoria en ciertas sinapsis glutamatérgicas. Se piensa que estos procesos están en la base de una gran parte de los fenómenos de aprendizaje y memoria que ocurren en el cerebro.

Todos nuestros resultados indican que el IGF-I puede actuar como un modulador de la actividad de los receptores de glutamato en células granulares de cerebelo. Mediante esta modulación el IGF-I podría estar participando en **procesos de plasticidad** en el cerebelo que, a su vez, podrían ser la expresión molecular de ciertos procesos de aprendizaje y memoria que se producen en esta estructura. En el cerebelo el IGF-I tiene una gran importancia funcional, expresándose en gran abundancia durante el desarrollo embrionario y manteniendo unos niveles elevados durante la vida adulta del animal. Dentro del cerebelo la síntesis del IGF-I, su receptor y sus moléculas transportadoras se produce en localizaciones anatómicas muy precisas lo que sugiere una alta especificidad de funciones (*García-Segura, L. M. et al., 1997*).

Hay un número creciente de evidencias que apoyan la hipótesis de que los factores tróficos pueden modular procesos de aprendizaje y memoria. Desde hace tiempo se conoce que los factores tróficos inducen cambios en la eficacia de las sinapsis (*Lessmann, V., 1998b*) y que son capaces de inducir y modular procesos de plasticidad a largo plazo como la LTP (*Gottschalk, W. et al., 1998; Kang, H. et al., 1995*). Recientemente, sin embargo, se ha sugerido una implicación directa de los factores tróficos en procesos de aprendizaje y memoria. En el caso de las **neurotrofinas** se sabe que el BDNF tiene influencia sobre el aprendizaje espacial (*Mizuno, M. et al., 2000*) así como durante el aprendizaje contextual se produce un aumento en la expresión de este factor trófico en hipocampo (*Hall, J. et al., 2000*). El ratón Knock Out condicional para el receptor de neurotrofinas, Trk-B, presenta tanto una inhibición del aprendizaje de tareas complejas como una bloqueo de la LTP en el área CA1 de hipocampo (*Minichiello, L. et al., 1999*) lo que, de nuevo, sugiere un nexo de unión entre **factores tróficos, plasticidad sináptica y aprendizaje**.

En el caso del **IGF-I**, datos indirectos obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que puede estar mediando procesos de **plasticidad sináptica** a largo plazo en el cerebelo (*Castro-Alamancos, M. A. et al., 1993*). Se ha visto que la co-estimulación de la corteza cerebelar con glutamato e IGF-I (tanto exógeno como endógeno, liberado por estimulación eléctrica de la oliva inferior) produce una depresión específica y duradera de la liberación de GABA (el neurotransmisor de las células de Purkinje) en la zona de terminación de los axones de las células de Purkinje: los núcleos profundos del cerebelo. Esta depresión duradera se asemeja a la **LTD** cerebelar e incluso es posible que parte de su ruta de señalización intracelular sea común ya que resulta bloqueada al utilizar inhibidores específicos de proteínas implicadas en la LTD (*Castro-Alamancos, M. A. et al., 1996*). Muy recientemente el grupo de Linden ha confirmado estos resultados indirectos, observando mediante registros electrofisiológicos que tanto el IGF-I como la insulina son capaces de producir una depresión prolongada de las corrientes inducidas por el AMPA en células de

Purkinje en cultivo (Wang, Y. T. et al., 2000). Esta LTD es específica para las respuestas de AMPA y no ocurre con las respuestas del receptor de NMDA.

Se sabe que el cerebelo está implicado en el **aprendizaje** de varios tipos de respuestas motoras condicionadas como son el fenómeno del parpadeo condicionado y la adaptación del reflejo vestibulo-ocular (Raymond, J. L. et al., 1996; Ito, M., 1989). Recientemente se ha descubierto que los factores tróficos podrían estar implicados en la mediación de este tipo de aprendizaje cerebelar. En el caso de las **neurotrofinas** se ha visto que, tanto los ratones mutantes *wagglers* que presentan una deficiencia en la expresión de BDNF cerebelar (Bao, S. et al., 1998), como los ratones *stargazer* que presentan una deficiencia cerebelar para el receptor de neurotrofinas TrkB (Hashimoto, K. et al., 1999), tienen impedido el aprendizaje del parpadeo condicionado lo que refuerza la hipótesis de la influencia de los factores tróficos sobre estos fenómenos.

En el caso del **IGF-I**, experimentos realizados en nuestro laboratorio en los que se bloqueó temporalmente la síntesis del IGF-I endógeno procedente de la oliva inferior, produjeron una inhibición reversible del **aprendizaje** del parpadeo condicionado (Castro-Alamancos, M. A. et al., 1994), lo que sugiere una participación del IGF-I en este tipo de procesos de aprendizaje y memoria. Hay multitud de evidencias que sugieren que el fenómeno de la LTD cerebelar contribuye a los fenómenos de **aprendizaje motor** que se producen en el cerebelo (Raymond, J. L. et al., 1996; Ito, M., 1989) por lo que tanto el hecho de que el IGF-I sea capaz de inducir una depresión prolongada (LTD) de la actividad de las células de Purkinje (Wang, Y. T. et al., 2000), como el hecho de que sea capaz de producir una depresión de la actividad de los receptores de AMPA, apoyan la hipótesis de que el IGF-I podría estar modulando este tipo de procesos.

Desde finales de la década de los 90 se han ido acumulando evidencias que sugieren la participación del IGF-I y la insulina en multitud de funciones cognitivas incluyendo procesos de aprendizaje y memoria. En el caso del Alzheimer se han hecho numerosos estudios en los que se ha visto que tratamientos con insulina producen una sustancial mejoría de la memoria verbal

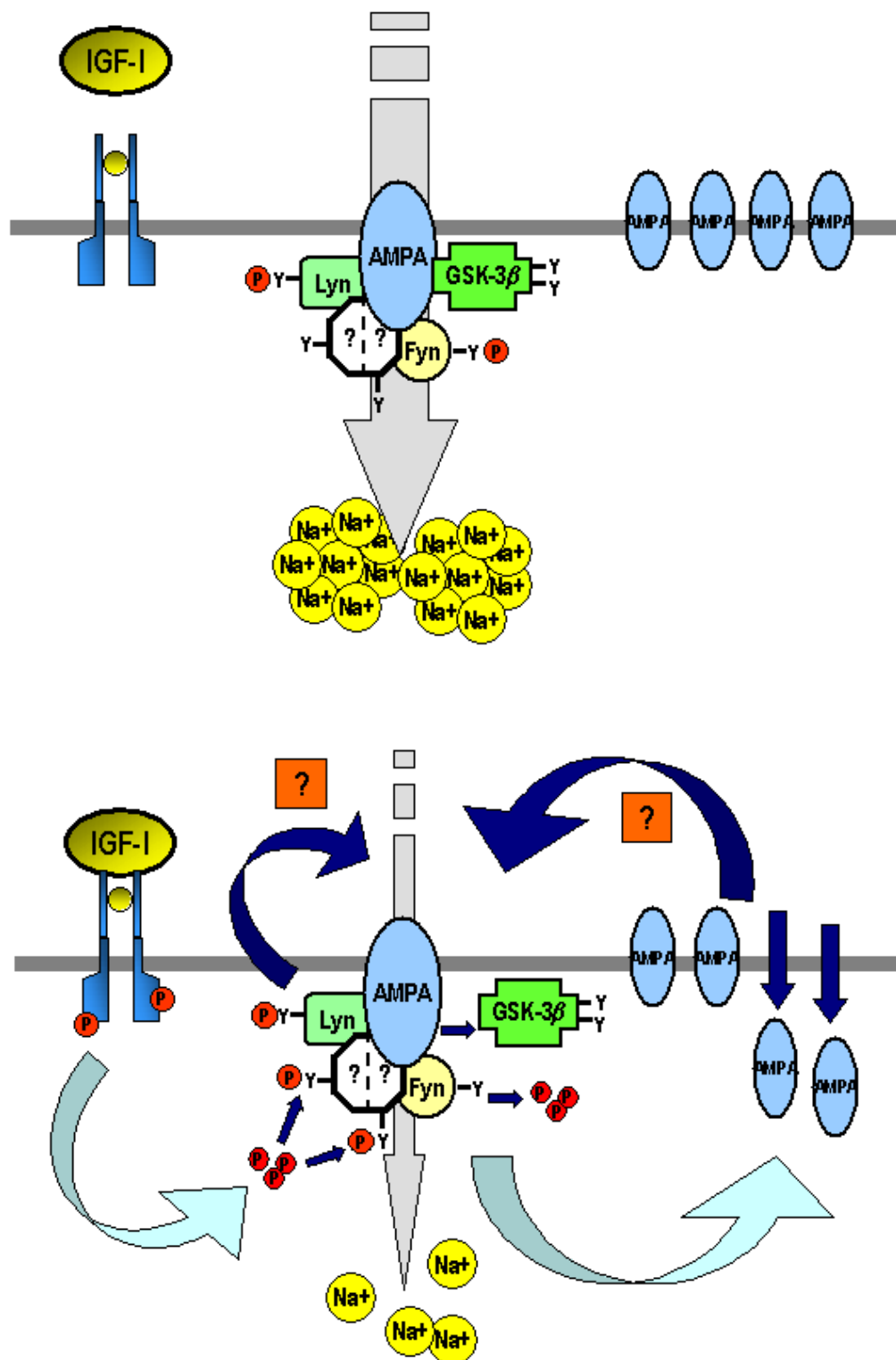
de pacientes de Alzheimer (*Craft, S. et al., 1996*). También en enfermos de Alzheimer se ha podido detectar una reducción muy significativa de la concentración de insulina e IGF-I en líquido cefalorraquídeo (*Craft, S. et al., 1998*) así como un ligero aumento del número de receptores de insulina acompañado de una enorme reducción de su funcionalidad (*Hoyer, S., 1997*). En ratas adultas se ha visto que cuando se destruyen los receptores de insulina mediante inyección intraventricular de estreptozocina se produce una pérdida progresiva y duradera tanto de la memoria de trabajo como de la memoria de referencia en tareas pasivas (*Lannert, H. et al., 1998*). También en ratas se ha visto que el aprendizaje espacial induce un aumento en la expresión del receptor de insulina en hipocampo (*Zhao, W. et al., 1999*). En el caso del **IGF-I** se ha visto que el tratamiento mediante inyección ventricular de ratas senescentes con este factor trófico reduce la pérdida de la capacidad de reconocimiento “*de novo*” y mejora significativamente el rendimiento en tareas de discriminación espacial (*Markowska, A. L. et al., 1998*).

Una gran parte de los trabajos publicados hasta el momento han interpretado los efectos del IGF-I y la insulina sobre los procesos de aprendizaje y memoria como efectos neurotróficos lentos relacionados, fundamentalmente, con una alteración del metabolismo de la glucosa. Sin embargo nuestros resultados junto con los de otra serie de grupos, sugieren que el IGF-I tiene un efecto directo sobre la actividad de los receptores de glutamato, modulando la plasticidad de las sinapsis y, muy posiblemente, participando en procesos cognitivos.

Se han observado efectos similares de este factor trófico sobre tipos celulares muy distintos (células granulares, células de Purkinje, células de hipocampo, células CHO transfectadas, etc.) (*Wang, Y. T. et al., 2000; Man, Y. H. et al., 2000*), así como se ha visto modulación de procesos cognitivos en diferentes áreas por lo que es muy probable que el IGF-I esté mediando procesos plásticos similares en estructuras cerebrales distintas. Sin embargo los mecanismos por los cuales el IGF-I produce su efecto modulador permanecen aún desconocidos por lo que es necesario continuar investigando.

**RESUMEN FINAL:**

- El IGF-I produce una modulación diferencial de la actividad de los receptores ionotrópicos de glutamato en células granulares de cerebelo. Este efecto modulador es rápido y podría estar mediado por distintos mecanismos entre los que se incluyen la internalización/externalización de las subunidades de los receptores de glutamato, la fosforilación/desfosforilación de proteínas asociadas a las subunidades del receptor, la modulación de la asociación del receptor con diferentes proteínas, etc.
- El IGF-I produce una internalización de la subunidad GluR2 del receptor de AMPA lo que podría estar mediando el efecto modulador del IGF-I sobre la actividad de estos receptores.
- El IGF-I modula de forma distinta al menos a tres proteínas diferentes asociadas a los complejos multimoleculares del receptor de AMPA. Estas proteínas, al igual que la mayor parte de las proteínas que interaccionan con el receptor de AMPA, se asocian específicamente a la subunidad 2/3. Esta especificidad ha sido observada por otros grupos lo que sugiere que es muy probable que sea la subunidad 2 la que esté actuando como reguladora y que, posiblemente, sea la subunidad que medie la acción moduladora del IGF-I.
- Todos estos efectos neuromoduladores del IGF-I observados por nosotros junto con las observaciones realizadas por otros grupos sugieren que este factor trófico podría actuar como un mediador fisiológico de la plasticidad sináptica y que podría estar participando en procesos de aprendizaje y memoria en diversas estructuras cerebrales.



**Discusión, figura 4:** Depresión de las respuestas del receptor de AMPA por IGF-I. Posible mecanismo de modulación.

## CONCLUSIONES

---

Las conclusiones de este trabajo de tesis son las siguientes:

1. El IGF-I actúa como modulador de las respuestas de los receptores de glutamato en células granulares de cerebelo. El IGF-I tiene un efecto diferencial, produciendo una modulación distinta para cada tipo de receptor: deprime las respuestas del receptor de AMPA, potencia las respuestas del receptor de Kainato y no modifica las respuestas del receptor de NMDA.
2. El IGF-I, al igual que el glutamato, promueve una rápida internalización de la subunidad 2 del receptor de AMPA.
3. Las proteínas-quinasa Lyn, Fyn y GSK-3 $\beta$  se asocian específicamente a la subunidad 2/3 del receptor de AMPA en células granulares de cerebelo.
4. El IGF-I modifica tanto el estado de fosforilación en tirosinas de algunas de estas proteínas como su asociación con el receptor de AMPA, lo que podría ser responsable del efecto final de depresión de las respuestas de dicho receptor. Esta es la primera observación de un efecto regulador de la función de un receptor debido a la modulación simultánea de numerosos eventos (internalización, fosforilación/desfosforilación y asociación/ disociación) por la influencia de un único modulador: el IGF-I.
5. El IGF-I aumenta la fosforilación en tirosinas de una proteína desconocida asociada a Fyn y a Lyn mientras que disminuye el estado de fosforilación en tirosina de la proteína Fyn. No modifica el estado de fosforilación de Lyn y GSK-3 $\beta$ .
6. El IGF-I no modifica la asociación con GluR2/3 de las proteínas Lyn y Fyn mientras que reduce la asociación entre GluR2/3 y GSK-3 $\beta$ .
7. La modulación de los receptores de glutamato dependiente de IGF-I podría tener efectos sobre la plasticidad sináptica y podría estar

participando en procesos de aprendizaje y memoria en diversas estructuras cerebrales.



## BIBLIOGRAFÍA

---

1. **Agnati, L. F., Cortelli,P., Pettersson,R., and Fuxe,K.** "The concept of trophic units in the central nervous system". *Prog.Neurobiol.* (1995) 46:561-574.
2. **Allison, D. W., Gelfand,V.I., Spector,I., and Craig,A.M.** "Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors". *J.Neurosci.* (1998) 18:2423-2436.
3. **Arai, M. and Cohen,J.A.** "Subcellular localization of the F5 protein to the neuronal membrane-associated cytoskeleton". *J.Neurosci.Res.* (1994) 38:348-357.
4. **Avruch, J.** "Insulin signal transduction through protein kinase cascades". *Mol.Cell Biochem.* (1998) 182:31-48.
5. **Balkowiec, A., Kunze,D.L., and Katz,D.M.** "Brain-derived neurotrophic factor acutely inhibits AMPA-mediated currents in developing sensory relay neurons". *J.Neurosci.* 2000.Mar.1.;20.(5.):1904.-11.
6. **Bao, S., Chen,L., Qiao,X., Knusel,B., and Thompson,R.F.** "Impaired eye-blink conditioning in waggler, a mutant mouse with cerebellar BDNF deficiency". *Learn.Mem.* (1998) 5:355-364.
7. **Bar, R.S., Boes, M., Clemmons, D.R., Busby, W.H., Sandra, A., Dake, B.L. and Booth, B.A.** "Insulin differentially alters transcapillary movement of intravascular IGFBP-1, IGFBP-2 and endothelial cell IGF binding proteins in rat heart". *Endocrinology* (1990) 127:497-99.

8. **Barria, A., Muller,D., Derkach,V., Griffith,L.C., and Soderling,T.R.** "Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation". *Science* (1997) 276:2042-2045.
  
9. **Bence-Hanulec, K. K., Marshall,J., and Blair,L.A.** "Potentiation of neuronal L calcium channels by IGF-1 requires phosphorylation of the alpha1 subunit on a specific tyrosine residue". *Neuron* (2000) 27:121-131.
  
10. **Bessho, Y., Nakanishi,S., and Nawa,H.** "Glutamate receptor agonists enhance the expression of BDNF mRNA in cultured cerebellar granule cells". *Brain Res.Mol.Brain Res.* (1993) 18:201-208.
  
11. **Bettler, B. and Mulle,C.** "Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors". *Neuropharmacology* (1995) 34:123-139.
  
12. **Bhat, R. V., Shanley,J., Correll,M.P., Fieles,W.E., Keith,R.A., Scott,C.W., and Lee,C.M.** "Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (2000) 97:11074-11079.
  
13. **Binoux, M.** "The IGF system in metabolism regulation". *Diabete Metab* (1995) 21:330-337.
  
14. **Blair, L. A. and Marshall,J.** "IGF-1 modulates N and L calcium channels in a PI 3-kinase-dependent manner". *Neuron* (1997) 19:421-429.
  
15. **Blair, L. A., Bence-Hanulec,K.K., Mehta,S., Franke,T., Kaplan,D., and Marshall,J.** "Akt-dependent potentiation of L channels by insulin-like growth factor- 1 is required for neuronal survival". *J.Neurosci.* (1999) 19:1940-1951.

16. **Bliss, T.V.P. and Collingridge, G.L.** "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus". *Nature* (1993) 361:31-39.
  
17. **Bolton, M. M., Blanpied, T.A., and Ehlers, M.D.** "Localization and stabilization of ionotropic glutamate receptors at synapses". *Cell Mol. Life Sci.* (2000) 57:1517-1525.
  
18. **Bondy, C. A.** "Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons". *J. Neurosci.* (1991) 11:3442-3455.
  
19. **Bondy, C.A., Werner, H. and Roberts, C.T.** "Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II". *Neurosci.* (1992) 46:909-23.
  
20. **Bortolotto, Z. A., Fitzjohn, S.M., and Collingridge, G.L.** "Roles of metabotropic glutamate receptors in LTP and LTD in the hippocampus". *Curr. Opin. Neurobiol.* (1999a) 9:299-304.
  
21. **Bortolotto, Z. A., Clarke, V.R., Delany, C.M., Parry, M.C., Smolders, I., Vignes, M., Ho, K.H., Miu, P., Brinton, B.T., Fantaske, R., Ogden, A., Gates, M., Ornstein, P.L., Lodge, D., Bleakman, D., and Collingridge, G.L.** "Kainate receptors are involved in synaptic plasticity". *Nature* (1999b) 402:297-301.
  
22. **Braithwaite, S. P., Meyer, G., and Henley, J.M.** "Interactions between AMPA receptors and intracellular proteins". *Neuropharmacology* (2000) 39:919-930.
  
23. **Burnett, P. E., Blackshaw, S., Lai, M.M., Qureshi, I.A., Burnett, A.F., Sabatini, D.M., and Snyder, S.H.** "Neurabin is a synaptic protein linking p70

S6 kinase and the neuronal cytoskeleton". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1998) 95:8351-8356.

24. **Carmignoto, G., Pizzorusso,T., Tia,S., and Vicini,S.** "Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor potentiate excitatory synaptic transmission in the rat visual cortex". *J.Physiol (Lond)* (1997) 498:153-164.
25. **Caroni, P. and Grandes, P.** "Nerve sprouting in innervated adult muscle induced by exposure to elevated levels of insulin-like growth factors" *J. Cell. Biol.* (1990) 110:1307-13.
26. **Carroll, R. C., Beattie,E.C., Xia,H., Luscher,C., Altschuler,Y., Nicoll,R.A., Malenka,R.C., and von Zastrow,M.** "Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1999) 96:14112-14117.
27. **Carvalho, A. L., Kameyama,K., and Huganir,R.L.** "Characterization of phosphorylation sites on the glutamate receptor 4 subunit of the AMPA receptors". *J.Neurosci.* (1999) 19:4748-4754.
28. **Castillo, P. E., Malenka,R.C., and Nicoll,R.A.** "Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons". *Nature* (1997) 388:182-186.
29. **Castro Alamancos, M. A. and Torres Aleman,I.** "Learning of the conditioned eye-blink response is impaired by an antisense insulin-like growth factor I oligonucleotide". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (1994) 91:10203-10207.
30. **Castro-Alamancos, M. A. and Torres-Aleman,I.** "Long-term depression of glutamate-induced gamma-aminobutyric acid release in cerebellum by

insulin-like growth factor I". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (1993) 90:7386-7390.

31. **Castro-Alamancos, M. A., Arevalo,M.A., and Torres-Aleman,I.** "Involvement of protein kinase C and nitric oxide in the modulation by insulin-like growth factor-I of glutamate-induced GABA release in the cerebellum". *Neuroscience* (1996) 70:843-847.
32. **Chik, C. L., Li,B., Karpinski,E., and Ho,A.K.** "Insulin and insulin-like growth factor-I inhibit the L-type calcium channel current in rat pinealocytes". *Endocrinology* (1997) 138:2033-2042.
33. **Clemmons, D.R., Busby, H.B., Arai, T., Nam, T.J., Clarke, J.B, Jones, J.I. and Ankrapp, D.K.** "Role of insulin-like growth factor binding proteins in the control of IGF actions". *Prog. Growth Factor Res.* (1995) 6:357-66.
34. **Cobb, M. H. and Goldsmith,E.J.** "How MAP kinases are regulated". *J.Biol.Chem.* (1995) 270:14843-14846.
35. **Combettes-Souverain, M. and Issad,T.** "Molecular basis of insulin action". *Diabetes Metab* (1998) 24:477-489.
36. **Contractor, A., Swanson,G.T., Sailer,A., O'Gorman,S., and Heinemann,S.F.** "Identification of the kainate receptor subunits underlying modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 region of the hippocampus". *J.Neurosci.* (2000) 20:8269-8278.
37. **Courtneidge, S. A., Fumagalli,S., Koegl,M., Superti-Furga,G., and Twamley-Stein,G.M.** "The Src family of protein tyrosine kinases: regulation and functions". *Dev.Suppl* (1993) 57-64.

38. **Craft, S., Newcomer,J., Kanne,S., Dagogo-Jack,S., Cryer,P., Sheline,Y., Luby,J., Dagogo-Jack,A., and Alderson,A.** "Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer's disease". *Neurobiol.Aging* (1996) 17:123-130.
  
39. **Craft, S., Peskind,E., Schwartz,M.W., Schellenberg,G.D., Raskind,M., and Porte,D.** "Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype". *Neurology* (1998) 50:164-168.
  
40. **Cui, H., Meng,Y., and Bulleit,R.F.** "Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta activity regulates proliferation of cultured cerebellar granule cells". *Brain Res.Dev.Brain Res.* (1998) 111:177-188.
  
41. **Daughaday, W.H. and Rotwein, P.** "Insulin like growth factor I and II. Peptide, messenger, ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations". *Endocr. Rev.* (1989) 10(1):68-91.
  
42. **de Pablo, F. and de la Rosa,E.J.** "The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors [see comments]". *Trends Neurosci.* (1995) 18:143-150.
  
43. **Delbono, O., Renganathan,M., and Messi,M.L.** "Regulation of mouse skeletal muscle L-type Ca<sup>2+</sup> channel by activation of the insulin-like growth factor-1 receptor". *J.Neurosci.* (1997) 17:6918-6928.
  
44. **DiCicco-Bloom, E., Cohen, R.C. and Black, I.B.** "Insulin growth factors regulate mitosis and survival in cultured cerebellar granule cells and precursors". *Soc. Neurosci. Abstr.* (1989) 134.5.

45. **Dong, H., O'Brien,R.J., Fung,E.T., Lanahan,A.A., Worley,P.F., and Huganir,R.L.** "GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors". *Nature* (1997) 386:279-284.
46. **Dong, H., Zhang,P., Song,I., Petralia,R.S., Liao,D., and Huganir,R.L.** "Characterization of the glutamate receptor-interacting proteins GRIP1 and GRIP2". *J.Neurosci.* (1999) 19:6930-6941.
47. **Easter, S. S., Jr., Purves,D., Rakic,P., and Spitzer,N.C.** "The changing view of neural specificity". *Science* (1985) 230:507-511.
48. **Feldman, E. L., Sullivan,K.A., Kim,B., and Russell,J.W.** "Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival". *Neurobiol.Dis.* (1997) 4:201-214.
49. **Fischer, M., Kaech,S., Knutti,D., and Matus,A.** "Rapid actin-based plasticity in dendritic spines". *Neuron* (1998) 20:847-854.
50. **Fischer, M., Kaech,S., Wagner,U., Brinkhaus,H., and Matus,A.** "Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines". *Nat.Neurosci.* (2000) 3:887-894.
51. **Froech, E.R., Schmid C., Schwander, J. and Zapt, J.** "Actions of insulin-like growth factors". *Ann. Rev. Physiol.* (1985) 47:443-67.
52. **Garcia-Segura, L. M., Rodriguez,J.R., and Torres-Aleman,I.** "Localization of the insulin-like growth factor I receptor in the cerebellum and hypothalamus of adult rats: an electron microscopic study". *J.Neurocytol.* (1997) 26:479-490.
53. **Goold, R. G., Owen,R., and Gordon-Weeks,P.R.** "Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B

regulates the stability of microtubules in growth cones". *J.Cell Sci.* (1999) 112:3373-3384.

54. **Gottschalk, W., Pozzo-Miller,L.D., Figurov,A., and Lu,B.** "Presynaptic modulation of synaptic transmission and plasticity by brain-derived neurotrophic factor in the developing hippocampus". *J.Neurosci.* (1998) 18:6830-6839.
55. **Grant, S. G., O'Dell,T.J., Karl,K.A., Stein,P.L., Soriano,P., and Kandel,E.R.** "Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice [see comments]". *Science* (1992) 258:1903-1910.
56. **Guo, W., Kada,K., Kamiya,K., and Toyama,J.** "IGF-I regulates K(+)-channel expression of cultured neonatal rat ventricular myocytes". *Am.J.Physiol* (1997) 272:2599-2606.
57. **Gwag, B. J. and Springer,J.E.** "Activation of NMDA receptors increases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the hippocampal formation". *Neuroreport.* (1993) 5:125-128.
58. **Hall, J., Thomas,K.L., and Everitt,B.J.** "Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning". *Nat.Neurosci.* (2000) 3:533-535.
59. **Hamill, O. P., Marty,A., Neher,E., Sakmann,B., and Sigworth,F.J.** "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches". *Pflugers Arch.* (1981) 391:85-100.



60. **Hanissian, S. H., Chatila,T., and Sahyoun,N.E.** "Association of neuronal pp60c-src with growth cone glycoproteins of rat brain". *J.Neurobiol.* (1992) 23:803-813.
  
61. **Hashimoto, K., Fukaya,M., Qiao,X., Sakimura,K., Watanabe,M., and Kano,M.** "Impairment of AMPA receptor function in cerebellar granule cells of ataxic mutant mouse stargazer". *J.Neurosci.* (1999) 19:6027-6036.
  
62. **Hayashi T.** *Keio. J. Med.* (1954) 3:1883-92.
  
63. **Hayashi, T., Umemori,H., Mishina,M., and Yamamoto,T.** "The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn". *Nature* (1999) 397:72-76.
  
64. **Heidenreich, K. A.** "Insulin and IGF-I receptor signaling in cultured neurons". *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (1993) 692:72-88.
  
65. **Hernandez-Sanchez, C., Lopez-Carranza,A., Alarcon,C., de la Rosa,E.J., and de Pablo,F.** "Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1995) 92:9834-9838.
  
66. **Holman, G. D. and Kasuga,M.** "From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport". *Diabetologia* (1997) 40:991-1003.
  
67. **Hoyer, S.** "Models of Alzheimer's disease: cellular and molecular aspects". *J.Neural Transm.Suppl* (1997) 49 :11-21.
  
68. **Husi, H., Ward,M.A., Choudhary,J.S., Blackstock,W.P., and Grant,S.G.** "Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes [see comments]". *Nat.Neurosci.* (2000) 3:661-669.

69. **Ito, M.** "Long-term depression". *Annu.Rev.Neurosci.* (1989) 12:85-102.
70. **Ito, M.** "The cerebellum and neural control". (1984) *Raven Press, New York.*
71. **Ito, M. and Karachot, L.** "Protein kinases and phosphatase inhibitors mediating long-term desensitization of glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells". *Neurosci. Res.* (1992) 14:27-38.
72. **Ito, M., Sakurai, M. and Tongroach, P.** "Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells". *J. Physiol. Lond.* (1982) 324:113-34.
73. **Iwasaki, Y., Gay,B., Wada,K., and Koizumi,S.** "Association of the Src family tyrosine kinase Fyn with TrkB". *J.Neurochem.* (1998) 71:106-111.
74. **Jones, J.I. and Clemmons, D.R.** "Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions". *Endocr. Rev.* (1995) 16:3-33.
75. **Jones, J.I., Gockerman, A., Busby, W.H., Camacho-Hubner, C. and Clemmons, D.R.** "Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiations of the effects of IGF-I". *J. Cell. Biol.* (1993a) 121:679-687.
76. **Jones, J.I., Gockerman, A., Busby, W.H., Wright, G. and Clemmons, D.R.** "Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the 5-beta-1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993b) 90:10553-57.
77. **Julien, J. P. and Mushynski,W.E.** "Neurofilaments in health and disease". *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* (1998) 61:1-23.

78. **Kafitz, K. W., Rose,C.R., Thoenen,H., and Konnerth,A.** "Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors". *Nature* (1999) 401:918-921.
  
79. **Kang, H. and Schuman,E.M.** "Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus". *Science* (1995) 267:1658-1662.
  
80. **Kanzaki, M., Zhang,Y.Q., Mashima,H., Li,L., Shibata,H., and Kojima,I.** "Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I". *Nat.Cell Biol.* (1999) 1:165-170.
  
81. **Kar, S., Seto,D., Dore,S., Hanisch,U., and Quirion,R.** "Insulin-like growth factors-I and -II differentially regulate endogenous acetylcholine release from the rat hippocampal formation". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1997) 94:14054-14059.
  
82. **Karkanas, N. B. and Papke,R.L.** "Subtype-specific effects of lithium on glutamate receptor function". *J.Neurophysiol.* (1999) 81:1506-1512.
  
83. **Kim, B. and Feldman,E.L.** "Differential regulation of focal adhesion kinase and mitogen-activated protein kinase tyrosine phosphorylation during insulin-like growth factor-I-mediated cytoskeletal reorganization". *J.Neurochem.* (1998) 71:1333-1336.
  
84. **Kleppisch, T., Klinz,F.J., and Hescheler,J.** "Insulin-like growth factor I modulates voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in neuronal cells". *Brain Res.* (1992) 591:283-288.
  
85. **Kohr, G. and Seeburg,P.H.** "Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor-channels by protein tyrosine kinases of the src family". *J.Physiol (Lond)* (1996) 492 (2):445-452.

86. **Kornau, H. C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., and Seeburg, P.H.** "Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95". *Science* (1995) 269:1737-1740.
87. **Kornau, H. C., Seeburg, P.H., and Kennedy, M.B.** "Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins". *Curr. Opin. Neurobiol.* (1997) 7:368-373.
88. **Lannert, H. and Hoyer, S.** "Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats". *Behav. Neurosci.* (1998) 112:1199-1208.
89. **LaTour, D., Mohan, S., Linkhart, T.A., Baylink, D.J. and Stong, D.D.** "Inhibitory insulin-like growth factor-binding protein: cloning, complete sequence, physiological regulation". *Mol. Endocrinol.* (1990) 4:1806-14.
90. **Lauterborn, J. C., Lynch, G., Vanderklish, P., Arai, A., and Gall, C.M.** "Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons". *J. Neurosci.* 2000. Jan. 1.; 20.(1.):8.-21. 20:8-21.
91. **Lee, G., Newman, S.T., Gard, D.L., Band, H., and Panchamoorthy, G.** "Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases". *J. Cell Sci.* (1998) 111:3167-3177.
92. **Lee, H. K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F., and Huganir, R.L.** "Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity". *Nature* (2000) 405:955-959.

93. **Lee, H. K., Kameyama, K., Huganir, R.L., and Bear, M.F.** "NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus". *Neuron* (1998) 21:1151-1162.
94. **Lei, S., Lu, W.Y., Xiong, Z.G., Orser, B.A., Valenzuela, C.F., and MacDonald, J.F.** "Platelet-derived growth factor receptor-induced feed-forward inhibition of excitatory transmission between hippocampal pyramidal neurons". *J. Biol. Chem.* (1999) 274:30617-30623.
95. **Lenoir, D. and Honegger, P.** "Insulin-like growth factor I stimulates DNA synthesis in fetal rat brain cell cultures". *Dev. Brain. Res.* (1983) 7:205-213.
96. **Leonard, A. S., Davare, M.A., Horne, M.C., Garner, C.C., and Hell, J.W.** "SAP97 is associated with the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit". *J. Biol. Chem.* (1998) 273:19518-19524.
97. **Lerma, J.** "Kainate reveals its targets". *Neuron* (1997) 19:1155-1158.
98. **Lerma, J., Morales, M., Vicente, M.A., and Herreras, O.** "Glutamate receptors of the kainate type and synaptic transmission". *Trends Neurosci.* (1997) 20:9-12.
99. **LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D. and Roberts, C.T.** "Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor". *Endocr. Rev.* (1995) 16(2):143-63.
100. **Leroy, K. and Brion, J.P.** "Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain". *J. Chem. Neuroanat.* (1999) 16:279-293.

101. **Lesort, M., Jope,R.S., and Johnson,G.V.** "Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase". *J.Neurochem.* (1999) 72:576-584.
  
102. **Lesser, S. S., Sherwood,N.T., and Lo,D.C.** "Neurotrophins differentially regulate voltage-gated ion channels". *Mol.Cell Neurosci.* (1997) 10:173-183.
  
103. **Lessmann, V.** "Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS". *Gen.Pharmacol.* (1998) 31:667-674.
  
104. **Lessmann, V., Gottmann,K., and Heumann,R.** "BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones". *Neuroreport.* (1994) 6:21-25.
  
105. **Levi-Montalcini.** "The nerve growth factor 35 years later". *Science* (1987) 237:1154-62.
  
106. **Levine, E. S., Crozier,R.A., Black,I.B., and Plummer,M.R.** "Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (1998) 95:10235-10239.
  
107. **Levine, E. S., Dreyfus,C.F., Black,I.B., and Plummer,M.R.** "Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1995) 92:8074-8077.
  
108. **Li, Y. X., Zhang,Y., Lester,H.A., Schuman,E.M., and Davidson,N.** "Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons". *J.Neurosci.* (1998) 18:10231-10240.

109. **Lin, J. W. and Sheng,M.** "NSF and AMPA receptors get physical". *Neuron* (1998) 21:267-270.
110. **Linden, D.J.** "Long-term synaptic depression in the mammalian brain". *Neuron* (1994) 12:457-72.
111. **Lindholm, D., Carroll, P., Tzimagiogis, G. and Thoenen, H.** "Autocrine-paracrine regulation of hippocampal neuron survival by IGF-I and the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4". *Eur. J. Neurosci.* (1996) 8:1452-60.
112. **Lindholm, D., da Penha,B., Cooper,J., Thoenen,H., and Castren,E.** "Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4 increase neurotrophin-3 expression in the rat hippocampus". *Int.J.Dev.Neurosci.* (1994) 12:745-751.
113. **Liu, L., Brown,J.C., III, Webster,W.W., Morrisett,R.A., and Monaghan,D.T.** "Insulin potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity in *Xenopus* oocytes and rat hippocampus". *Neurosci.Lett.* (1995) 192:5-8.
114. **Lohof, A. M., Ip,N.Y., and Poo,M.M.** "Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF". *Nature* (1993) 363:350-353.
115. **Luscher, C., Nicoll,R.A., Malenka,R.C., and Muller,D.** "Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane". *Nat.Neurosci.* (2000) 3:545-550.
116. **Luscher, C., Xia,H., Beattie,E.C., Carroll,R.C., von Zastrow,M., Malenka,R.C., and Nicoll,R.A.** "Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity". *Neuron* (1999) 24:649-658.
117. **Man, Y. H., Lin,J.W., Ju,W.H., Ahmadian,G., Liu,L., Becker,L.E., Sheng,M., and Wang,Y.T.** "Regulation of AMPA receptor-mediated

synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization". *Neuron* (2000) 25:649-662.

118. **Markowska, A. L., Mooney,M., and Sonntag,W.E.** "Insulin-like growth factor-1 ameliorates age-related behavioral deficits ". *Neuroscience* (1998) 87:559-569.
119. **Mathi, S. K., Chan,J., and Watt,V.M.** "Insulin receptor-related receptor messenger ribonucleic acid: quantitative distribution and localization to subpopulations of epithelial cells in stomach and kidney". *Endocrinology* (1995) 136:4125-4132.
120. **Matsuda, S., Mikawa,S., and Hirai,H.** "Phosphorylation of serine-880 in GluR2 by protein kinase C prevents its C terminus from binding with glutamate receptor-interacting protein". *J.Neurochem.* (1999) 73:1765-1768.
121. **Matus, A.** "Postsynaptic actin and neuronal plasticity". *Curr.Opin.Neurobiol.* (1999) 9:561-565.
122. **McAllister, A. K., Lo,D.C., and Katz,L.C.** "Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex". *Neuron* (1995) 15:791-803.
123. **McMorris, F.A. and Dubois-Dalcq, M.** "Insulin-like growth factor I promotes cell proliferation and oligodendroglial commitment in rat glial progenitor cells developing in vitro". *J. Neurosci. Res.* (1988) 21:199-209.
124. **Michaelis, E.K.** "Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging". *Progress in Neurobiol.* (1998) 54:369-415.
125. **Minichiello, L., Korte,M., Wolfer,D., Kuhn,R., Unsicker,K., Cestari,V., Rossi-Arnaud,C., Lipp,H.P., Bonhoeffer,T., and Klein,R.** "Essential role



for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning". *Neuron* (1999) 24:401-414.

126. **Mizuno, M., Yamada,K., Olariu,A., Nawa,H., and Nabeshima,T.** "Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats". *J.Neurosci.* (2000) 20:7116-7121.
127. **Mori, H. and Mishina,M.** "Structure and function of the NMDA receptor channel". *Neuropharmacology* (1995) 34:1219-1237.
128. **Moss, S. J., Blackstone,C.D., and Huganir,R.L.** "Phosphorylation of recombinant non-NMDA glutamate receptors on serine and tyrosine residues". *Neurochem.Res.* (1993) 18:105-110.
129. **Nakanishi, H., Obaishi,H., Satoh,A., Wada,M., Mandai,K., Satoh,K., Nishioka,H., Matsuura,Y., Mizoguchi,A., and Takai,Y.** "Neurabin: a novel neural tissue-specific actin filament-binding protein involved in neurite formation". *J.Cell Biol.* (1997) 139:951-961.
130. **Nakazawa, K., Tadakuma,T., Nokihara,K., and Ito,M.** "Antibody specific for phosphorylated AMPA-type glutamate receptors at GluR2 Ser-696". *Neurosci.Res.* (1995) 24:75-86.
131. **Nakazawa, T., Komai,S., Tezuka,T., Hisatsune,C., Umemori,H., Semba,K., Mishina,M., Manabe,T., and Yamamoto,T.** "Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR{epsilon}2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor". *J.Biol.Chem.* (2000) :
132. **Narisawa-Saito, M., Carnahan,J., Araki,K., Yamaguchi,T., and Nawa,H.** "Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression of AMPA

receptor proteins in neocortical neurons". *Neuroscience* (1999a) 88:1009-1014.

133. **Narisawa-Saito, M., Silva,A.J., Yamaguchi,T., Hayashi,T., Yamamoto,T., and Nawa,H.** "Growth factor-mediated Fyn signaling regulates alpha-amino-3- hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor expression in rodent neocortical neurons [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1999 May 11;96(10):5890]". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1999b) 96:2461-2466.
  
134. **Nieto-Bona, M. P., Busiguina,S., and Torres-Aleman,I.** "Insulin-like growth factor I is an afferent trophic signal that modulates calbindin-28kD in adult Purkinje cells". *J.Neurosci.Res.* (1995) 42:371-376.
  
135. **Nieto-Bona, M. P., Garcia-Segura,L.M., and Torres-Aleman,I.** "Orthograde transport and release of insulin-like growth factor I from the inferior olive to the cerebellum". *J.Neurosci.Res.* (1993) 36:520-527.
  
136. **Nieto-Bona, M. P., Garcia-Segura,L.M., and Torres-Aleman,I.** "Transynaptic modulation by insulin-like growth factor I of dendritic spines in Purkinje cells". *Int.J.Dev.Neurosci.* (1997) 15:749-754.
  
137. **Nieto-Sampedro, M. and Verdú, E.** "Lesiones del sistema nervioso: respuesta neuronal y reparación". *Manual de Neurociencia* (1998). Editores: Delgado J.M., Ferrús A, Mora F. and Rubia F.J. Editorial Síntesis.
  
138. **Numakawa, T., Takei,N., Yamagishi,S., Sakai,N., and Hatanaka,H.** "Neurotrophin-elicited short-term glutamate release from cultured cerebellar granule neurons". *Brain Res.* (1999) 842:431-438.

139. **O'Dell, T.J., Kandel, E.R. and Grant, S.G.N.** "Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors". *Nature* (1991) 353:558-60.
140. **O'Brien, R. J., Lau,L.F., and Huganir,R.L.** "Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at excitatory synapses". *Curr.Opin.Neurobiol.* (1998) 8:364-369.
141. **Ocrant, I., Fay, C.T. and Parmelee, J.T.** "Characterization of insulin-like growth factor binding proteins produced in the rat nervous system". *Endocrinology* (1990) 127:1260-67.
142. **Oppenheim, R.W.** "Cell death during development of the nervous system". *Ann. Rev. Neurosci.* (1991) 14:453-501.
143. **Ozawa, S., Kamiya,H., and Tsuzuki,K.** "Glutamate receptors in the mammalian central nervous system". *Prog.Neurobiol.* (1998) 54:581-618.
144. **Patterson, S., Grover, L.M., Schwartzkroin, P.A. and Bothwell, M.** "Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs". *Neuron* (1992) 9(6):1081-88.
145. **Peruzzi, F., Prisco,M., Dews,M., Salomoni,P., Grassilli,E., Romano,G., Calabretta,B., and Baserga,R.** "Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis". *Mol.Cell Biol.* (1999) 19:7203-7215.
146. **Pin, J. P. and Duvoisin,R.** "The metabotropic glutamate receptors: structure and functions". *Neuropharmacology* (1995) 34:1-26.

- 147. Purves, D.** "Body and brain: a trophic theory of neural connections". 1988. *Cambridge: Harward University Press.*
- 148. Raizada, M.K. and LeRoith, D.** "Insulin-like growth factor receptors. Implications for nervous system function" *In the Role of insulin-like growth factor in the nervous system. Annals of the New York Academy of Sciences* (1993) 692:30.
- 149. Raymond, J. L., Lisberger,S.G., and Mauk,M.D.** "The cerebellum: a neuronal learning machine?". *Science* (1996) 272:1126-1131.
- 150. Raymond, L. A., Tingley,W.G., Blackstone,C.D., Roche,K.W., and Huganir,R.L.** " Glutamate receptor modulation by protein phosphorylation". *J.Physiol Paris* (1994) 88 :181-192.
- 151. Rinderknecht, E. and Humbel, R.E.** "The aminoacid sequence of insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin". *J. Biol. Chem.* (1978) 253:2769.
- 152. Roche, K. W., O'Brien,R.J., Mammen,A.L., Bernhardt,J., and Huganir,R.L.** "Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit". *Neuron* (1996) 16:1179-1188.
- 153. Roche, K. W., Tingley,W.G., and Huganir,R.L.** "Glutamate receptor phosphorylation and synaptic plasticity". *Curr.Opin.Neurobiol.* (1994) 4:383-388.
- 154. Rodriguez-Moreno, A. and Lerma,J.** "Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function". *Neuron* (1998) 20:1211-1218.

155. **Rodriguez-Moreno, A., Herreras,O., and Lerma,J.** "Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus". *Neuron* (1997) 19:893-901.
156. **Sakuta, H.** "Potentiation by insulin and insulin-like growth factor-1 of glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> currents in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes". *Eur.J.Pharmacol.* (1994) 268:375-380.
157. **Sala, C. and Sheng,M.** "The fyn art of N-methyl-D-aspartate receptor phosphorylation". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1999) 96:335-337.
158. **Salmon, W.D. and Daughaday, W.H.** "A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro". *J. Lab. Clin. Med.* (1957) 49:825.
159. **Salter, M. W.** "Src, N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, and synaptic plasticity". *Biochem.Pharmacol.* (1998) 56:789-798.
160. **Sara, V.R., Hall, K.** "Insulin-like growth factors and their binding proteins". *Physiol. Rev.* (1990) 70:591-614.
161. **Seeburg, P. H.** "TINS/TIPS lecture: The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels.". *TINS* (1997)
162. **Shaw, M., Cohen,P., and Alessi,D.R.** "Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216". *FEBS Lett.* (1997) 416:307-311.
163. **Shi, S. H., Hayashi,Y., Petralia,R.S., Zaman,S.H., Wenthold,R.J., Svoboda,K., and Malinow,R.** "Rapid spine delivery and redistribution of

AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation". *Science* (1999) 284:1811-1816.

164. **Shimatsu, A. and Rotwein, P.** "Mosaic evolution of the insulin-like growth factors. Organization, sequence and expression of the rat insulin-like growth factor I". *J. Bio. Chem.* (1987) 262:7894.
165. **Shinar, Y. and McMorris, F.A.** "Developing oligodendroglia express mRNA for insulin-like growth factor-I, a regulator of oligodendrocyte development". *Neurosci. Res.* (1995) 42:516-27.
166. **Shorte, S. L.** "N-methyl-D-aspartate evokes rapid net depolymerization of filamentous actin in cultured rat cerebellar granule cells". *J. Neurophysiol.* (1997) 78:1135-1143.
167. **Smart, T. G.** "Regulation of excitatory and inhibitory neurotransmitter-gated ion channels by protein phosphorylation". *Curr. Opin. Neurobiol.* (1997) 7:358-367.
168. **Sobko, A., Peretz, A., and Attali, B.** "Constitutive activation of delayed-rectifier potassium channels by a src family tyrosine kinase in Schwann cells". *EMBO J.* (1998) 17:4723-4734.
169. **Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T.A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Köhler, M., Takagi, T., Sakmann, B. and Seeburg, P.H.** "Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS". *Science* (1990) 249:1580-85.
170. **Song, D. K., Choe, B., Bae, J.H., Park, W.K., Han, I.S., Ho, W.K., and Earm, Y.E.** "Brain-derived neurotrophic factor rapidly potentiates synaptic transmission through NMDA, but suppresses it through non-NMDA receptors in rat hippocampal neuron". *Brain Res.* (1998) 799:176-179.

171. **Song, I., Kamboj,S., Xia,J., Dong,H., Liao,D., and Huganir,R.L.** "Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors [see comments]". *Neuron* (1998) 21:393-400.
  
172. **Srivastava, S., Osten,P., Vilim,F.S., Khatri,L., Inman,G., States,B., Daly,C., DeSouza,S., Abagyan,R., Valtschanoff,J.G., Weinberg,R.J., and Ziff,E.B.** "Novel anchorage of GluR2/3 to the postsynaptic density by the AMPA receptor-binding protein ABP". *Neuron* (1998) 21:581-591.
  
173. **Sun, X. J., Pons,S., Asano,T., Myers,M.G., Jr., Glasheen,E., and White,M.F.** "The Fyn tyrosine kinase binds Irs-1 and forms a distinct signaling complex during insulin stimulation". *J.Biol.Chem.* (1996) 271:10583-10587.
  
174. **Tanaka, T., Saito,H., and Matsuki,N.** "Inhibition of GABA<sub>A</sub> synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus". *J.Neurosci.* (1997) 17:2959-2966.
  
175. **Tezuka, T., Umemori,H., Akiyama,T., Nakanishi,S., and Yamamoto,T.** "PSD-95 promotes Fyn-mediated tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1999) 96:435-440.
  
176. **Torres-Alemán, I., Pons, S. and Santos-Benito, F.F.** "Survival of Purkinje cells in cerebellar cultures is increased by insulin-like growth factor-I" *Eur. J. Neurosci.* (1992) 4:864-69.
  
177. **Torres-Aleman, I., Pons,S., and Arevalo,M.A.** "The insulin-like growth factor I system in the rat cerebellum: developmental regulation and role in neuronal survival and differentiation". *J.Neurosci.Res.* (1994) 39:117-126.

178. **Torres-Aleman, I., Pons,S., and Garcia-Segura,L.M.** "Climbing fiber deafferentation reduces insulin-like growth factor I (IGF-I) content in cerebellum". *Brain Res.* (1991) 564:348-351.
  
179. **Torres-Aleman, I., Villalba,M., and Nieto-Bona,M.P.** "Insulin-like growth factor-I modulation of cerebellar cell populations is developmentally stage-dependent and mediated by specific intracellular pathways". *Neuroscience* (1998) 83:321-334.
  
180. **Tseng, H. C., Lu,Q., Henderson,E., and Graves,D.J.** "Phosphorylated tau can promote tubulin assembly". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1999) 96:9503-9508.
  
181. **Turrigiano, G. G.** "AMPA receptors unbound: membrane cycling and synaptic plasticity". *Neuron* (2000) 26:5-8.
  
182. **Utton, M. A., Vandecandelaere,A., Wagner,U., Reynolds,C.H., Gibb,G.M., Miller,C.C., Bayley,P.M., and Anderton,B.H.** "Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase 3beta affects the ability of tau to promote microtubule self-assembly". *Biochem.J.* (1997) 323:741-747.
  
183. **Van Harreveld, A.** "Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle". *J.Neurochem.* (1959) 3:300-15.
  
184. **van Rossum, D. and Hanisch,U.K.** "Cytoskeletal dynamics in dendritic spines: direct modulation by glutamate receptors?". *Trends Neurosci.* (1999) 22:290-295.
  
185. **Wan, Q., Xiong,Z.G., Man,H.Y., Ackerley,C.A., Branton,J., Lu,W.Y., Becker,L.E., MacDonald,J.F., and Wang,Y.T.** "Recruitment of functional



- GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin". *Nature* (1997) 388:686-690.
186. **Wang, Y. T. and Linden,D.J.** "Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis". *Neuron* (2000) 25:635-647.
  187. **Wang, Z. M., Messi,M.L., Renganathan,M., and Delbono,O.** "Insulin-like growth factor-1 enhances rat skeletal muscle charge movement and L-type Ca<sup>2+</sup> channel gene expression". *J.Physiol (Lond)* (1999) 516:331-341.
  188. **Wechsler, A. and Teichberg,V.I.** "Brain spectrin binding to the NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin". *EMBO J.* (1998) 17:3931-3939.
  189. **Werner, H., Hernandez-Sanchez,C., Karnieli,E., and LeRoith,D.** "The regulation of IGF-I receptor gene expression". *Int.J.Biochem.Cell Biol.* (1995) 27:987-994.
  190. **Werner, H., Woloschak, M., Adamo M., Shen-Orr, Z., Roberts, C.T. and LeRoith, D.** "Developmental regulation of the rat insulin-like growth factor I receptor gene". *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86:7451-55.
  191. **Werther, G.A., Abate, M., Hogg A., Cheesman, H., Oldfield, B., Hards, D., Hudson, P., Power, B., Freed, K., and Herington, A.C.** "Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in rat brain by in situ hybridization-relationship to IGF-I receptors". *Mol. Endocr.* (1990) 4:773-78.
  192. **Wheal, H. V., Chen,Y., Mitchell,J., Schachner,M., Maerz,W., Wieland,H., van Rossum,D., and Kirsch,J.** "Molecular mechanisms that underlie structural and functional changes at the postsynaptic membrane during synaptic plasticity". *Prog.Neurobiol.* (1998) 55:611-640.

193. **Wyszynski, M., Lin,J., Rao,A., Nigh,E., Beggs,A.H., Craig,A.M., and Sheng,M.** "Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor". *Nature* (1997) 385:439-442.
  
194. **Xia, J., Zhang,X., Staudinger,J., and Huganir,R.L.** "Clustering of AMPA receptors by the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1". *Neuron* (1999) 22:179-187.
  
195. **Yao, D.L., West, N.R., Bondy, C.A., Brenner, M., Hudson, L.D., Zhou, J., Collins, G.H. and Webster, H.D.** "Cryogenic spinal cord injury induces astrocytic gene expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 during myelin regeneration". *J. Neurosci. Res.* (1995) 40:647-59.
  
196. **Yuzaki, M., Forrest, D., Verselis, L.M., Sun, S.C., Curran, T. and Connor, J.A.** "Functional NMDA receptors are transiently active and support the survival of Purkinje cells in culture". *J. Neurosci.* (1996) 16(15):4651-61.
  
197. **Zafra, F., Hengeler,B., Leibrock,J., Thoenen,H., and Lindholm,D.** "Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors". *EMBO J.* (1990) 9:3545-3550.
  
198. **Zamanillo, D., Sprengel,R., Hvalby,O., Jensen,V., Burnashev,N., Rozov,A., Kaiser,K.M., Koster,H.J., Borchardt,T., Worley,P., Lubke,J., Frotscher,M., Kelly,P.H., Sommer,B., Andersen,P., Seeburg,P.H., and Sakmann,B.** "Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning". *Science* (1999) 284:1805-1811.
  
199. **Zhao, W., Chen,H., Xu,H., Moore,E., Meiri,N., Quon,M.J., and Alkon,D.L.** "Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated

changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats". *J.Biol.Chem.* (1999) 274:34893-34902.

- 200. Zona, C., Ciotti,M.T., and Calissano,P.** "Human recombinant IGF-I induces the functional expression of AMPA/kainate receptors in cerebellar granule cells". *Neurosci.Lett.* (1995) 186:75-78.